

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal)**



**MECANISMOS MOLECULARES DE LA  
INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO INTESTINAL  
VASOACTIVO (VIP) Y EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF-I)  
EN SU ACCIÓN TRÓFICA SOBRE LAS CÉLULAS  
LACTROPAS DE HIPÓFISIS DE RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Miriam Fernández Fernández

Bajo la dirección de los doctores

Lucinda Cacicedo Egües

Franco Sánchez-Franco

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1688-1**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Dpto. de BIOLOGÍA ANIMAL II (FISIOLOGÍA ANIMAL)**

**TESIS DOCTORAL**

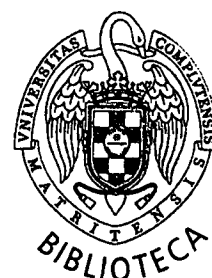


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**



5317338590

**MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO  
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO  
SIMILAR A LA INSULINA (IGF-I) EN SU ACCIÓN TRÓFICA SOBRE LAS  
CÉLULAS LACTOTROPAS DE HIPÓFISIS DE RATA**



Memoria presentada para optar al grado de

**Doctor en Ciencias Biológicas**

por

**MIRIAM FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

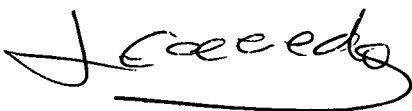
**Madrid, 2002**

Madrid, Junio de 2002

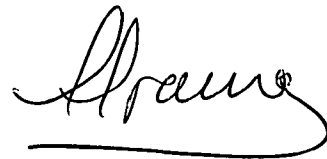
Lucinda Cacicedo Egüés y Franco Sánchez-Franco, Doctores en Medicina, han dirigido y supervisado el trabajo titulado "MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCION DEL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF-I) EN SU ACCIÓN TRÓFICA SOBRE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS DE HIPOFISIS DE RATA", que se ha realizado en el Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal y el Hospital Carlos III-Instituto de Salud Carlos III.

El presente estudio contribuye al mejor conocimiento de la acción de VIP e IGF-I en la hipófisis y aporta nuevos datos sobre la interacción de estos factores y de los mecanismos moleculares de sus acciones biológicas.

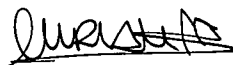
Por su alta calidad, novedad e interés actual, este trabajo se estima merecedor de ser aceptado como TESIS DOCTORAL en la Facultad de Ciencias Biológicas (Departamento de Biología Animal II-Fisiología Animal) de la Universidad Complutense de Madrid.



Fdo. L. Cacicedo Egüés



Fdo. F. Sánchez-Franco



Fdo. M. Fernández Fernández

**A mi madre**



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente estudio se ha llevado a cabo en el laboratorio del Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal, con el soporte económico del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.

Estos años para mí han sido muy duros y he tenido la gran suerte de conocer personas extraordinarias, a las que tengo mucho que agradecer porque han contribuido a que haya podido realizar esta Tesis.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Lucinda Cacicedo y al Dr. Franco Sánchez Franco, mis directores de Tesis, su dirección científica, su eterna ilusión por el trabajo y su constante e inestimable apoyo en todo momento. Gracias por contribuir a mi formación y haberme dado la oportunidad de realizar este sueño que con tanta ilusión he llevado a cabo.

A todos mis compañeros de laboratorio, con quienes he compartido muchas horas duras y difíciles, pero también muchas otras más alegres. Gracias por todo a Nuria, Consti e Isabel, compañeras y amigas, no sólo por su maravillosa colaboración científica sino, fundamentalmente, por la amistad y cariño que me han ofrecido, así como la confianza que han depositado en mi trabajo y en mí. Gracias también a M<sup>a</sup> Eugenia, Esther, Paula, M<sup>a</sup> Paz y María por su amistad, ánimo y valioso apoyo que me han prestado en todo momento.

Quisiera agradecer a todo el personal, tanto del área clínica como del laboratorio, el interés y apoyo que de ellos he recibido. También al Dr. José A. Balsa por su inestimable colaboración científica y por escucharme en muchos momentos.

A Lali, Carolina y Marival les agradezco su amable colaboración en las técnicas citoquímicas y su ayuda cuando la he necesitado. A Elena Nieto por su amistad e interés, agradeciéndole todo el apoyo y cariño mostrado hacia mí.

Quiero agradecer al equipo del Hospital Carlos III su amable disposición y el apoyo profesional para realizar este trabajo, especialmente a Rocío por su ayuda y ánimo, con la que espero conservar siempre nuestra amistad. También al Dr. Gumersindo Fernández y a la Dra. Elvira Melián por su colaboración científica e interés por la evolución de mi trabajo.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Lorenzo y a la Dra. Ana Aranda les agradezco su amable disposición y colaboración para poder realizar este estudio.

Al Dr. Antonio Tormo le agradezco su actitud generosa y constante e incansable apoyo en todo momento. También, a la Dra. Adelina Gamallo, por su ánimo e interés por mi trabajo.

A mis amigos Ana y Oscar gracias por todo. He tenido la gran suerte de conocerlos y no tendría espacio para explicar todo lo que significáis para mí. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme y a ofrecerme unas palabras alentadoras en momentos muy difíciles. Por vuestro apoyo, cariño y eterna amistad. Gracias también a Marina por su amistad y por haberme transmitido el ánimo y la tranquilidad que en muchos momentos he necesitado. Todos ellos harán que esta etapa de mi vida, en la que ha habido momentos muy duros y largas horas de trabajo, la recuerde con mucho cariño.

Gracias a mi familia, a mi padre y especialmente a mi tía Asun en la que tengo siempre un continuo apoyo y cariño.

A mi hermana Zulema gracias por todo, para mí eres la mejor. Gracias por tu cariño, paciencia y enorme comprensión que han sido imprescindibles para continuar. También a José Luis por la amistad y cariño que siempre me ha ofrecido.

Gracias a Félix por su amor y su generosidad conmigo, vital para seguir adelante. Por haber tenido tanta paciencia y aguantarme todos estos años, en los buenos y malos momentos. Muchas han sido las horas compartidas y la ayuda puesta por él en mi trabajo.

Finalmente, gracias a mi madre porque la debo todo. Siento que no pueda ver el resultado de este esfuerzo en el que tanta ilusión puso, pero sé que está orgullosa. Gracias por tu enorme cariño, comprensión y ayuda durante toda mi vida, y por enseñarme a superar todas las dificultades. Por el gran esfuerzo que siempre ha hecho para que yo me desarrollara profesionalmente y la ilusión que siempre ha tenido conmigo.

Por último, quisiera agradecer a las personas que se han interesado por mi trabajo y que de alguna manera han estado cerca de mí.

Gracias a todos

Miriam

# INDICE

<b>Clave de abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Hipófisis: aspectos morfológicos y funcionales.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Desarrollo embriológico de la hipófisis.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Morfología de la hipófisis.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Control neuroendocrino de la hipófisis.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Comunicación intracelular en la adenohipófisis.....</b>	<b>9</b>
1.4.1. Distribución anatómica de los tipos celulares.....	10
1.4.2. Factores que actúan como mensajeros paracrinós.....	11
<b>1.5. Aspectos morfológicos y funcionales de la célula lactotropa.....</b>	<b>12</b>
1.5.1. Morfología de la célula lactotropa.....	12
1.5.2. Regulación de la función de la célula lactotropa.....	12
- Señales hipotalámicas.....	15
- Señales periféricas.....	22
- Señales locales.....	24
<b>2. Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I).....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Estructura.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Distribución anatómica.....</b>	<b>30</b>
<b>2.3. Regulación de la expresión de IGF-I en la hipófisis.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4. Acciones biológicas.....</b>	<b>31</b>
2.4.1. Acción proliferativa.....	32
2.4.2. Acción anti-apoptótica.....	33
<b>2.5. Receptor y señales de transducción.....</b>	<b>34</b>
2.5.1. Vía de señalización de la MAPK.....	35
2.5.2. Vía de señalización de la PI3'-Kinasa.....	37
<b>3. Péptido intestinal vasoactivo (VIP).....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Estructura.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Distribución anatómica.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Regulación de VIP en la hipófisis.....</b>	<b>41</b>

3.4. Acciones biológicas.....	43
3.5. Mecanismo de señalización de VIP.....	46
4. Regulación de la expresión génica.....	50
4.1. Factor transcripcional CREB.....	50
4.2. Genes de expresión temprana.....	52
<b>Objetivos.....</b>	<b>54</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>59</b>
I. Cultivo primario de células hipofisarias de rata.....	60
- Material biológico.....	60
- Técnica del cultivo.....	60
- Medio de cultivo.....	61
- Procedimiento experimental.....	62
II. Cultivo de la línea celular GH4C1.....	62
- Medio de cultivo.....	62
- Procedimiento experimental.....	63
III. Radioinmunoensayo.....	63
- Marcaje radiactivo ( $I^{125}$ ) de PRL.....	64
- Procedimiento del RIA.....	64
IV. Análisis de proteínas por Western blot.....	65
- Obtención de extractos celulares totales.....	65
- Cuantificación de las proteínas.....	66
- Electroforesis y transferencia de las proteínas.....	66
- Detección de las proteínas (Inmunoblot).....	67
- Detección inmunológica de las proteínas quinasas.....	68
- Anticuerpos primarios empleados en el Western blot.....	70

<b>V. Técnicas citoquímicas</b>	70
- Fijación y preparación de cultivos celulares	70
- Inmunocitoquímica	70
- Análisis de proliferación celular: identificación de tipos celulares, cuantificación y determinación de los índices de marcaje	73
- Anticuerpos primarios empleados en estudios inmunocitoquímicos	74
<b>VI. Estudios con genes informadores (REPORTER GENE ASSAYS)</b>	74
- Vectores informadores utilizados	74
- Transformación, crecimiento bacteriano y extracción del ADN plasmídico	75
- Transfección transitoria mediada por lípidos	76
- Detección de la actividad $\beta$ -galactosidasa <i>in situ</i>	77
- Ensayo de la actividad luciferasa	78
- Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa	78
<b>VII. Producción de anticuerpos</b>	79
- Producción del antisuero anti-IGF-I	79
- Producción del antisuero anti-VIP	80
<b>VIII. Diseños experimentales</b>	81
<b>IX. Análisis estadístico</b>	90
<b>Resultados</b>	91
<b>1. Acción de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias</b>	92
1.1. Acción proliferativa dosis-tiempo-respuesta de IGF-I: determinación de la incorporación de BrdU	92

1.2. Acción proliferativa dosis-respuesta de IGF-I: cuantificación de PCNA.....	95
1.3. Efecto del bloqueo de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias: determinación de PCNA y de la incorporación de BrdU.....	97
<b>2. Acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas.....</b>	<b>101</b>
2.1. Efecto de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas: estudio tiempo-respuesta.....	101
2.2. Efecto de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas.....	104
2.3. Efecto del bloqueo de VIP endógeno sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.....	107
<b>3. Acción de IGF-I sobre la liberación de PRL.....</b>	<b>110</b>
<b>4. Mecanismo de acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas: vías de señalización.....</b>	<b>114</b>
4.1. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PKA y PI3'-Kinasa con inhibidores específicos sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.....	114
4.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA con inhibidores específicos sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por.....	120
<b>5. Estudio de la activación de las vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de IGF-I sobre las células hipofisarias.....</b>	<b>123</b>
5.1. Efecto de IGF-I sobre la activación de la vía MAPK: estudio tiempo-respuesta.....	123

5.2. Efecto de IGF-I sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa: estudio tiempo-respuesta.....	126
5.3. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PI3'-Kinasa y PKA sobre la activación de la vía MAPK/ERKs inducida por IGF-I.....	130
<b>6. Estudio de la activación de las vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de VIP sobre las células hipofisarias.....</b>	<b>132</b>
6.1. Efecto de VIP sobre la activación de la vía MAPK: estudio tiempo-respuesta.....	132
6.2. Efecto de VIP sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa: estudio tiempo-respuesta.....	135
6.3. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de la vía MAPK/ERKs inducida por VIP.....	137
<b>7. Acción de IGF-I y VIP sobre la activación del factor transcripcional CREB.....</b>	<b>139</b>
7.1. Estudio del efecto de IGF-I sobre la activación de CREB.....	139
7.1.1. Efecto de IGF-I sobre la activación de CREB: estudio tiempo-respuesta.....	139
7.1.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de CREB inducida por IGF-I.....	144
7.2. Estudio del efecto de VIP sobre la activación de CREB.....	147
7.2.1. Efecto de VIP sobre la activación de CREB: estudio tiempo-respuesta.....	147
7.2.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de CREB inducida por VIP.....	151
<b>8. Acción de IGF-I y VIP sobre la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE.....</b>	<b>153</b>
8.1. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión basal del gen de luciferasa (pGL3-Control).....	154



8.2. Efecto del FCS sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal unido a los diferentes elementos de respuesta.....	154
8.3. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal unido a los diferentes elementos de respuesta.....	156
8.4. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el elemento de respuesta CRE e inducida por IGF-I y VIP.....	159
<b>9. Estudio de la acción anti-apoptótica de IGF-I.....</b>	<b>164</b>
9.1. Efecto de IGF-I sobre los niveles de Bcl-2.....	164
9.2. Efecto del bloqueo de la vía PI3´Kinasa sobre los niveles de Bcl-2.....	167
9.3. Acción de IGF-I sobre la activación de Bad: estudio tiempo-respuesta.....	169
<b>Discusión.....</b>	<b>171</b>
<b>1. Acción proliferativa de IGF-I sobre las células hipofisarias.....</b>	<b>173</b>
<b>2. Acción proliferativa de IGF-I y VIP sobre las células lactotropas.....</b>	<b>174</b>
2.1. Participación de VIP endógeno en la acción de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas.....	175
2.2. Acción de IGF-I sobre la síntesis y liberación de PRL.....	177
<b>3. Vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas.....</b>	<b>179</b>
3.1. Participación de las vías MAPK, PKA y PI3´-Kinasa en la acción de IGF-I.....	179

3.2. Participación de las vías MAPK y PKA en la acción de VIP.....	181
4. Activación de las vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de IGF-I y VIP.....	183
5. Acción de IGF-I y VIP sobre la activación del factor transcripcional CREB.....	186
5.1. Participación de las vías MAPK y PKA en la acción de IGF-I sobre la activación de CREB.....	186
5.2. Implicación de las vías MAPK y PKA en la acción de VIP sobre la activación de CREB.....	188
6. Acción de IGF-I y VIP sobre la expresión de genes regulados por diferentes elementos de respuesta.....	189
7. Acción de IGF-I sobre la prevención de la apoptosis.....	194
<b>Conclusiones</b> .....	197
<b>Bibliografía</b> .....	200

aa	aminoácidos
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AH	Adenohipófisis
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora-1
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
As	Antisuero
As-IGF-I	Antisuero específico anti-IGF-I
As-VIP	Antisuero específico anti-VIP
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Vasopresina
BC	Bromocriptina
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina bovina
BSAc	BSA cristalina
CBP	Proteína de unión a CREB
Cdk	Proteína quinasa dependiente de ciclinas
Cdk <sub>i</sub>	Inhibidor de Cdk
cpm	Cuentas por minuto
CPS-II	Carbamoil fosfato sintetasa-II
CRE	Elemento de respuesta al AMPc
CREB	Proteína de unión al CRE
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNAasa	Desoxirribonucleasa
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
eIF-4E	Factor iniciador de la traducción eucariótico

EM	Eminencia media
ERKs	Quinasa regulada por señales extracelulares
E.S.	Error estándar
FCS	Suero fetal de ternera
FGFb	Factor de crecimiento de los fibroblastos básico
FSH	Hormona folículoestimulante
GABA	Acido gamma-amino butírico
GC	Glucocorticoides
GDP	Acido guanosín 5'-difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GH	Hormona del crecimiento
Gi	Proteína inhibidora ligadora de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Grb2	Proteína de unión a receptor de factor de crecimiento-2
GRF	Factor liberador de GH
Gs	Proteína estimuladora ligadora de nucleótidos de guanina
GTP	Acido guanosín 5'-trifosfato
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfanílico
HT	Hormonas tiroideas
5-HT	5-Hidroxitriptamina, Serotonina
IGFBP	Proteína de unión a los IGFs
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina-I
IGF-I R	Receptor de IGF-I
IGFs	Factores de crecimiento similares a la insulina
IgG	Inmunoglobulina G
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IRS	Sustratos del receptor de insulina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
LH	Hormona luteinizante
LI	Lóbulo intermedio
m	Media aritmética

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	MAPK/ERK quinasa
n	Número de elementos de la muestra
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NH	Neurohipófisis
NIDDK	Instituto Nacional de Artritis, Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (USA)
NPV	Núcleo paraventricular
ns	no significativo
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
OT	Oxitocina
p	probabilidad de error
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHDA	Haz periventricular dopaminérgico
PI3'-K	Fosfatidil inositol-3' quinasa
PIF	Factor inhibidor de la liberación de PRL
Pit-1	Factor de transcripción específico de hipófisis
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
POMC	Proopiomelanocortina
PRF	Factor liberador de PRL
PRL	Prolactina
PRL-IR	PRL inmunoreactiva
PSA	Persulfato amónico
RIA	Radioinmunoensayo
Rp-cAMPs	Adenosina-3', 5'-monofósforo-trioato
rpm	Revoluciones por minuto

rPRL	PRL de rata
Rsk	Proteína quinasa ribosomal S6
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SRE	Elemento de respuesta al suero
SRF	Factor de respuesta al suero
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
TCF	Factor del complejo ternario
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametil-etilendiamina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformador
THDA	Haz tuberohipofisario dopaminérgico
TIDA	Haz tuberoinfundibular dopaminérgico
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
Trk	Tirosina quinasa
u.d.a.	unidades densitométricas arbitrarias
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VIP-IR	VIP inmunoreactivo

# INTRODUCCION

# 1. HIPÓFISIS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES

## 1.1. Desarrollo embriológico de la hipófisis

La hipófisis es un pequeño órgano de unos 0,5 g de peso, en humanos, situada en la base del cráneo, en la silla turca. La hipófisis en mamíferos está unida al hipotálamo mediante conexiones vasculares y nerviosas, que constituyen el tallo hipofisario. Tradicionalmente se la ha subdividido anatómicamente en dos partes: adeno y neurohipófisis, consideradas como entidades separadas anatómicamente y funcionalmente, con distintos e independientes mecanismos de regulación.

Ontogenéticamente, la glándula hipofisaria se desarrolla al mismo tiempo que el núcleo hipotalámico que finalmente regula la respuesta homeostática en el organismo maduro (Dasen, 2001). Inicialmente, la hipófisis se localiza en la porción media de la cresta neural, inmediatamente anterior a las células de la placa neural que dan origen a los componentes hipotalámicos endocrinos del diencefalo ventral (Couly, 1988).

Después del desplazamiento de las células de la cresta neural, comienza la organogénesis de la glándula hipofisaria anterior (adenohipófisis) en el día 8.5 embrionario. La **adenohipófisis** (AH) se deriva del ectodermo bucal, a partir de la bolsa de Rathke (Kovacs, 1989). En la rata, después del día 10 de vida embrionaria, adenohipófisis y **neurohipófisis** (NH) inician una aproximación progresiva hasta confluir. Es entonces cuando un grupo de las células adenohipofisarias en contacto con la invaginación neuroectodérmica y, probablemente influidas por factores locales producidos por ésta, se diferencian de forma distinta al resto de las células de la AH, formando el **lóbulo intermedio** (LI) (Eakin, 1957). En el resto de los mamíferos el desarrollo del LI es variable. En el hombre aparece como una estructura diferenciada en el feto, integrándose en la AH poco antes del nacimiento, siendo prácticamente imperceptible en adultos (Osamura, 1985). La NH se



desarrolla a partir del neuroectodermo como una invaginación del suelo del diencéfalo. El componente neural de la NH consiste en axones y fibras nerviosas que proceden de neuronas neurosecretoras situadas en el núcleo supraóptico y paraventricular y que configuran los tractos supraópticohipofisario y paraventrículohipofisario.

Los distintos tipos celulares que integran la AH tienen un origen común. La aparición de cada tipo celular específico ocurre en respuesta a gradientes de señales transitorias que proceden de determinados centros organizadores (Scully, 2002). Esas señales inducen la expresión de reguladores transcripcionales, que actúan como activadores y represores. Estos factores, entre los que se encuentran Pit-1 y GATA-2, regulan la proliferación de precursores y la inducción de los distintos tipos celulares. La diferenciación de cada tipo celular requiere de una activación génica selectiva y de una determinada represión, que es específica de cada tipo celular.

## **1.2. Morfología de la hipófisis**

Atendiendo a su desarrollo embriológico la hipófisis se divide en dos partes:

- La **neurohipófisis** (NH), también denominada hipófisis posterior, compuesta a su vez por el tallo hipofisario y el lóbulo neural (Sheehan, 1982).

- La **adenohipófisis** (AH) o hipófisis anterior, que en la rata está integrada a su vez por: a) *pars distalis*, a la que corresponde el 80-90 % del peso de la glándula. Está compuesta por las células productoras de las hormonas hipofisarias clásicas (lactotropas, somatotropas, corticotropas, gonadotropas y tiotropas), células no diferenciadas o "células tronco" y las células folículo-estrelladas; b) *pars tuberalis*, que es la parte de la AH próxima al tallo hipofisario; no constituye una entidad morfológica en todos los mamíferos, pero cuando lo es, está compuesta esencialmente por las células gonadotropas y tiotropas; c) *pars intermedia* o LI, compuesta principalmente por células glandulares denominadas melanotropas y que, como hemos dicho,

tiene igual origen embriológico que el resto de la AH, estando separada de ésta por la hendidura hipofisaria. Por esta separación anatómica suele dividirse la hipófisis en lóbulo anterior, que comprende las pars distalis y tuberalis y el lóbulo posterior, compuesto por la pars intermedia y la NH.

La irrigación de la glándula se realiza por tres ramas de las arterias carótidas internas: las arterias hipofisarias superiores, medias e inferiores. Las primeras, emiten ramificaciones que se unen para formar un plexo en la porción inferior de la eminencia media y superior del tallo hipofisario; este plexo drena a través de los vasos portales largos que atraviesan el tallo hipofisario hacia la AH, donde forman una amplia red capilar. Las arterias hipofisarias medias e inferiores afluyen hacia el lóbulo posterior y tallo hipofisario, desde donde se establecen conexiones vasculares con la pars distalis a través de los vasos portales cortos.

La dirección del flujo sanguíneo entre el hipotálamo y la hipófisis y entre ambos lóbulos hipofisarios ha sido materia de amplio debate. El modelo actualmente más aceptado es el propuesto por Page en 1983 según el cual la sangre aportada por las carótidas llegaría al lóbulo posterior desde las arterias hipofisarias inferiores, justo antes de llegar a la eminencia media a través de las arterias hipofisarias superiores. Desde la eminencia media el caudal principal fluye por los vasos portales largos, atravesando el tallo hipofisario, hasta la pars distalis. Pero a la parte interna de ésta llega también sangre desde el lóbulo posterior, a través de rutas capilares (los vasos portales cortos), posibilitando la influencia de hormonas o neurotransmisores liberados en el LI o en la NH sobre las zonas adyacentes a éstos de las pars tuberalis y distalis.

### **1.3. Control neuroendocrino de la hipófisis**

La innervación de la hipófisis no es homogénea entre las partes que la componen. La NH es en sí misma una estructura neural compuesta por terminales nerviosos desmielinizados, procedentes principalmente de neuronas

magnocelulares localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular. Sus axones contienen gránulos de neurosecreción y no forman sinapsis, sino que terminan en los espacios perivasculares, donde estos gránulos liberan su contenido al torrente sanguíneo (Scharrer, 1954). Un segundo tipo de innervación procede de neuronas que contienen neurotransmisores e incluyen las neuronas dopaminérgicas del haz tuberohipofisario (THDA) originadas en el núcleo arcuato (Bjorklund, 1973), neuronas serotoninérgicas, que proceden del núcleo dorsal del rafe, neuronas gabaérgicas (Vincent, 1982) y colinérgicas (Barron, 1983).

Al LI llegan fibras del tracto tuberohipofisario procedentes del núcleo arcuato del hipotálamo. Se han identificado en distintos estudios bioquímicos e histoquímicos que entre los neurotransmisores que se liberan están la dopamina y la serotonina (Holzbauer, 1985; Léránth, 1983).

Las neuronas del tracto tuberoinfundibular, que secretan los factores hipofisiotróficos hipotalámicos, terminan en la eminencia media, en el plexo capilar que drena a los vasos portales largos, los cuales llegan a la adenohipófisis. La eminencia media tiene un componente neural (fibras nerviosas), vascular (plexos capilares y venas portales) y epitelial (pars tuberalis de la adenohipófisis). Muchas de las neuronas tuberohipofisarias que proyectan a la eminencia media son peptidérgicas (liberan TRH y VIP) y otras son bioaminérgicas, siendo las más importantes las dopaminérgicas (Wilson, 1985).

## **1.4. Comunicación intracelular en la adenohipófisis**

Existen diversas características morfológicas y bioquímicas en las células de la hipófisis anterior que apoyan la existencia de interacciones paracrinas en la glándula: la distribución anatómica de los diferentes tipos celulares hipofisarios; la presencia local de neuropéptidos, factores de crecimiento, aminas biógenas, citoquinas y derivados del ácido araquidónico; así, como los

efectos directos que estas sustancias ejercen sobre la liberación de las hormonas hipofisarias *in vitro*.

Las células secretoras de la adenohipófisis (AH), por lo tanto, estarán reguladas por la interacción de una gran variedad de factores: señales hipotalámicas (inhibidoras y estimuladoras), señales periféricas y señales locales producidas en la propia hipófisis.

#### **1.4.1. Distribución anatómica de los tipos celulares en la hipófisis**

En estudios previos se ha demostrado que la distribución anatómica de determinados grupos celulares en la AH constituye la base de un sistema de regulación local en la hipófisis anterior (Denef, 1986).

Los distintos tipos celulares de la AH no se disponen de una manera aleatoria. Así, las células gonadotropas y lactotropas se encuentran con frecuencia topográficamente asociadas, habiéndose descrito la existencia entre ellas de complejas uniones especializadas del tipo "macula adhaerens diminuta" (Horvath, 1977). Muchas de las células lactotropas rodean a las células gonadotropas. El número de células lactotropas y su afinidad por las células gonadotropas varía durante el desarrollo, a lo largo del ciclo estrual y existen diferencias relacionadas con el sexo (Sato, 1980). Estas interacciones gonadotropas-lactotropas parecen ser críticas, ya que ratones transgénicos deficientes en gonadotropinas contienen menos células lactotropas que el ratón normal (Seuntjens, 1999). Se ha sugerido que la subunidad- $\alpha$  de las glicoproteínas hipofisarias y la POMC (Tilemans, 1994) jueguen un papel importante en este efecto, pero podrían estar implicados también otros factores. También se ha observado que las células gonadotropas puedan secretar algún factor en respuesta a GnRH, que aumente la secreción de PRL (Andries, 1995). La localización de las células gonadotropas en la proximidad de los vasos portales sugiere que los productos secretados por estas células podrían entrar en los vasos e influir en otras células de la AH (Gross, 1983).

Por otro lado, también se ha observado que frecuentemente las células corticotropas se encuentran en yuxtaposición con las somatotropas, encontrándose en ocasiones proyecciones celulares que rodean a estas células y finalizan cerca de los capilares (Nakane, 1975).

La afinidad topográfica entre las células somatotropas y tirotropas está así mismo documentada (Yoshimura, 1980). Las células somatotropas pueden estar dispersas o agrupadas en "clusters", pero tanto las células somatotropas como tirotropas aparecen junto a los capilares. Estas asociaciones celulares apoyan la existencia de comunicaciones intercelulares en la adenohipófisis.

#### **1.4.2. Factores que actúan como mensajeros paracrinós en la adenohipófisis**

Existe un gran número de factores que influyen en la función de la hipófisis y que además, son producidos, secretados y actúan dentro de la AH regulando a las células secretoras hipofisarias (Schwartz, 2000). Los mensajeros intercelulares que intervienen a través de sistemas paracrinós son muy variados, incluyendo neurotransmisores, neuropéptidos, factores de crecimiento, citoquinas, derivados del ácido araquidónico, etc.

La hipófisis posee capacidad para sintetizar algunos neurotransmisores como la DA (Iturriza, 1983) y la acetilcolina (Carmeliet, 1989), y algunos tipos celulares como las células gonadotropas son capaces de concentrar 5-HT (Denef, 1986).

Algunos factores de crecimiento y neuropéptidos presentes en la hipófisis son capaces de controlar la proliferación y la migración celular, así como la producción y la secreción de hormonas hipofisarias por mecanismos autocrinos y paracrinós. Ciertos factores de crecimiento no solamente controlan la proliferación y la función de las células hipofisarias normales, sino que también pueden estar implicados en la etiopatogenia de los tumores hipofisarios (Missale, 1998).



Estos factores locales directamente o modulados por las señales hipotalámicas y periféricas, influyen sobre la función de las células secretoras de la AH por mecanismos autocrinos y paracrinos. La identificación y caracterización de un número creciente de interacciones intercelulares dentro de la AH representa una nueva dimensión para comprender la regulación fisiológica de esta glándula.

## **1.5. Aspectos morfológicos y funcionales de la célula lactotropa**

### **1.5.1. Morfología de la célula lactotropa**

Las células de la adenohipófisis que sintetizan y secretan PRL fueron inicialmente descritas por microscopía óptica usando técnicas de marcaje convencional. Esas células, denominadas lactotropas, comprenden entre el 20-50% de la población celular de la AH dependiendo del sexo y el estado fisiológico del animal. Ontogenéticamente, las células lactotropas, junto con las somatotropas y las tiotropas proceden de un linaje común de células hipofisarias, dependiente de Pit-1 (Cohen, 1996).

La morfología y distribución de las células lactotropas ha sido bien descrita en la rata (Tougard, 1994), donde las células que contienen PRL están escasamente distribuidas en la porción lateroventral del lóbulo anterior y están presentes como una banda adyacente al lóbulo intermedio (Nakane, 1975). Su forma es heterogénea, apareciendo con forma poliédrica o angular pero a veces redondeada u oval (De Paul, 1997).

### **1.5.2. Regulación de la función de la célula lactotropa**

La función de la célula lactotropa en la adenohipófisis está regulada por interacciones de señales extracelulares derivadas de distintos niveles: factores sintetizados y secretados por neuronas hipotalámicas, hormonas procedentes de las glándulas endocrinas periféricas y factores locales producidos en la propia glándula hipofisaria. Las células lactotropas, por lo tanto, estarán

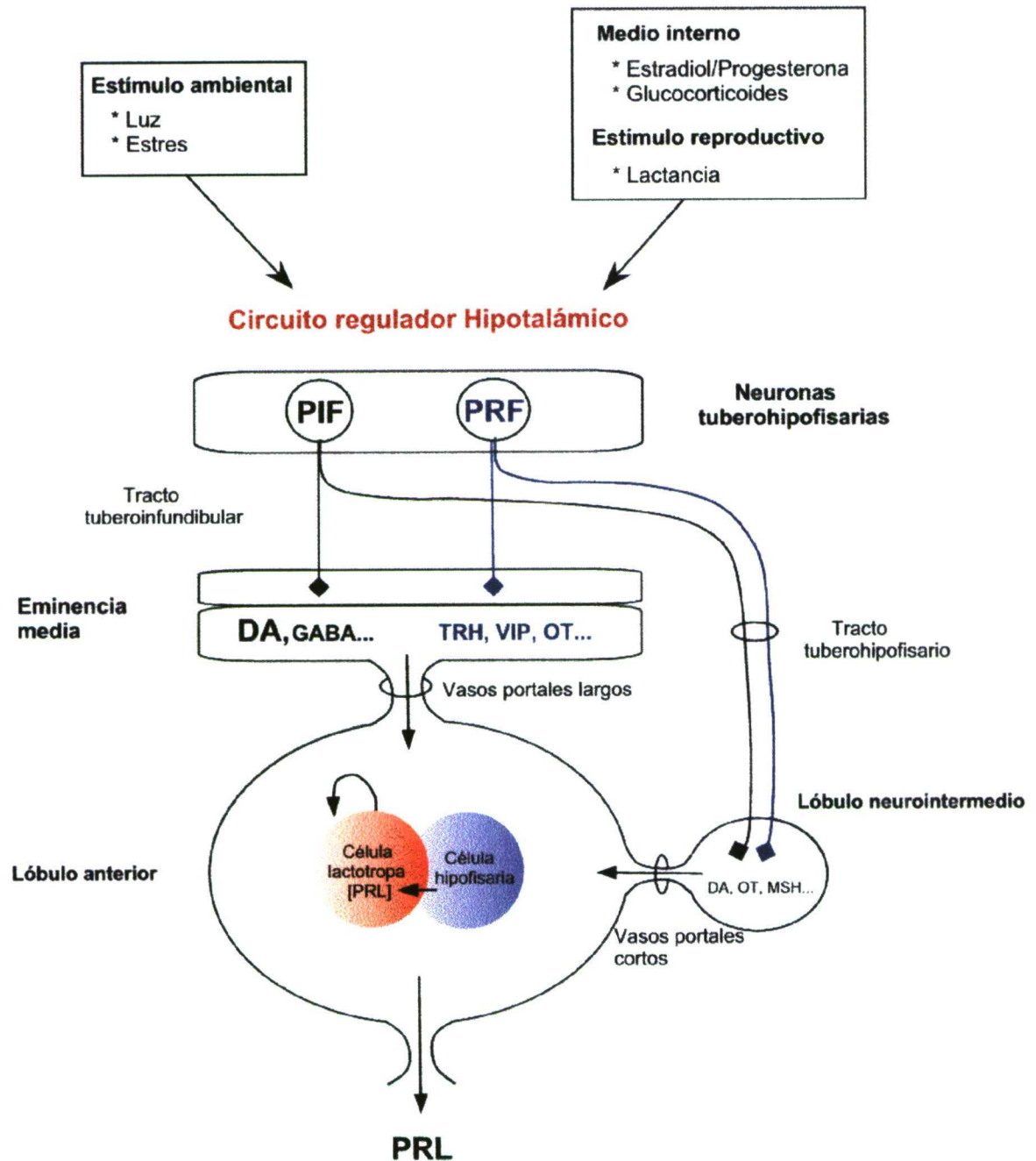
reguladas por la interacción de una gran variedad de señales centrales, periféricas o locales.

La secreción de PRL está controlada por señales inhibitoras y estimuladoras de origen hipotalámico que interactúan entre sí, pero que también dependen en su acción de la regulación ejercida por señales periféricas (Freeman, 2000). La dopamina es el gran regulador fisiológico de PRL, ejerciendo un control dominante inhibitor (Gale, 1961).

Fisiológicamente, tanto en la rata como en el hombre, puede observarse un patrón de secreción rítmica con dos picos que aparecen a media tarde y de madrugada, de 5 a 7 horas después de iniciarse el sueño. Se han descrito interacciones entre neuronas serotoninérgicas, vipérgicas, oxitocinérgicas y dopaminérgicas como responsables de esta ritmicidad (Arey y Freeman, 1989; 1990), en la que probablemente estén implicados los estrógenos (Pan, 1987; Cohen, 1988) justificando las diferencias intersexo que existen a este respecto (Meyer, 1976). La lactancia es uno de los estímulos fisiológicos más importantes de la secreción de PRL (Neill, 1974). Existen múltiples evidencias que demuestran la participación de la serotonina (5-HT) (Kordon, 1974), así como un descenso transitorio del tono dopaminérgico en la hiperprolactinemia que acompaña a la lactancia (Mena, 1976; Chiocchio, 1977; Selmanof, 1981; Demarest, 1983). En otras situaciones fisiológicas de aumento de PRL, tales como la preñez o la fase estrual, son los estrógenos los probables inductores de los cambios de secreción observados, actuando simultáneamente sobre las células lactotropas e hipotálamo, modulando las vías dopaminérgicas (Raymond, 1978; Blum, 1981) y serotoninérgicas (Caligaris, 1974).

La existencia de un control neuroendocrino permite la integración de estímulos ambientales (luz, estrés) y estímulos fisiológicos (lactancia, preñez) en la secreción de PRL. La vía común final de estos estímulos son la neuronas neuroendocrinas tuberohipofisarias que elaboran un patrón de factores inhibitorios de la liberación de PRL (PIFs) como dopamina y GABA, o de factores liberadores de PRL (PRFs) como TRH, VIP y oxitocina (Figura 1). Los PIFs y PRFs de las neuronas neuroendocrinas pueden ser liberados a la

eminencia media o al lóbulo neurointermedio, el cual es conectado al lóbulo anterior de la hipófisis por los vasos portales cortos. Además, la secreción de PRL está influida por las propias células lactotropas (regulación autocrina) o por otras células hipofisarias (regulación paracrina) (Figura 1).



**Figura 1.** Regulación de la secreción de PRL.



Aunque ninguna situación fisiológica que implique cambios en la función de las células lactotropas y de los niveles de PRL, se puede atribuir en exclusiva a un único factor modulador, para un mejor entendimiento de la regulación de PRL, a continuación se detallan los distintos niveles de regulación que se han ido consolidando.

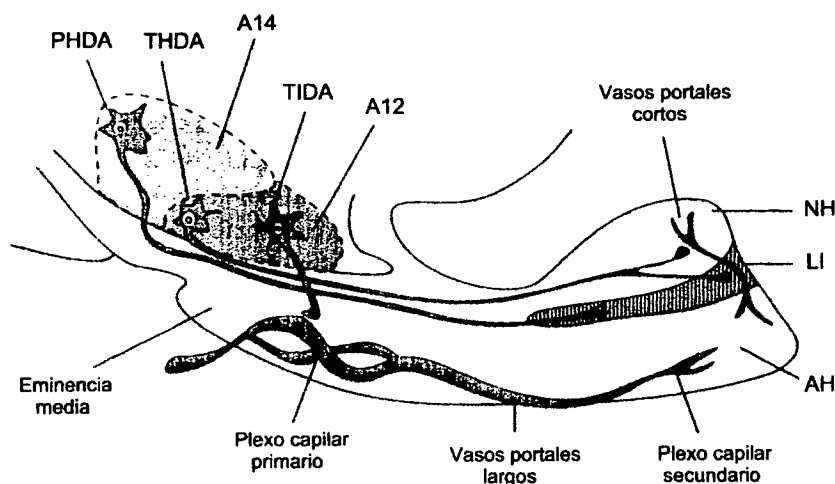
### **\*Señales hipotalámicas reguladoras de la función de la célula lactotropa**

Las células lactotropas están bajo el control de aminas biogénicas y neuropéptidos procedentes del hipotálamo.

#### **• Dopamina**

El hipotálamo ejerce sobre la secreción de PRL un control dominante inhibitorio a través de la DA (Gale, 1961).

Las poblaciones neuronales dopaminérgicas pueden dividirse en tres sistemas diferentes anatómica y funcionalmente basados en la distribución rostrocaudal y sus áreas terminales en los distintos lóbulos de la glándula hipofisaria (Figura 2). Las neuronas del haz dopaminérgico tuberoinfundibular (TIDA) están localizadas principalmente en la parte dorsomedial del núcleo arcuato (A12) y proyectan hacia la zona externa de la eminencia media (EM) formando un denso plexo (Kawano, 1987), donde la dopamina es liberada en el espacio perivascular rodeando los capilares del sistema portal hipofisario. Los lóbulos intermedio y neural de la glándula hipofisaria están inervados por dos grupos independientes de neuronas hipotalámicas dopaminérgicas. Las neuronas (A14) del haz dopaminérgico periventricular (PHDA) están localizadas en el núcleo periventricular hipotalámico y terminan en el lóbulo intermedio (Goudreau, 1995). Por otro lado, las neuronas del haz dopaminérgico tuberohipofisario (THDA) están localizadas en el núcleo arcuato rostral (A12) y proyectan a los lóbulos intermedio y neural de la glándula hipofisaria (Holzbauer, 1985) (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de los sistemas dopaminérgicos hipotalámicos que regulan PRL.

La dopamina que procede del haz tuberoinfundibular (TIDA) y es liberada a través de los vasos portales largos a los capilares del lóbulo anterior, se ha considerado el principal regulador fisiológico de la secreción de PRL (Leong, 1983). Sin embargo, también el haz THDA modula la secreción de PRL liberando DA en el LI y en la NH, la cual actúa de forma directa sobre las células lactotropas al ser transportada hasta la AH por los vasos portales cortos (Ben-Jonathan, 1980). Durante la lactancia y en la última tarde del proestro disminuye la DA en la eminencia media, así como la actividad del haz TIDA (Selmanoff, 1981; Chiochio, 1977). Las neuronas de los tractos TIDA/THDA están regulados por un variado número de neuropéptidos y neurotransmisores que participan en la regulación de la secreción de PRL, así como por la PRL y los estrógenos (Ben-Jonathan, 2001).

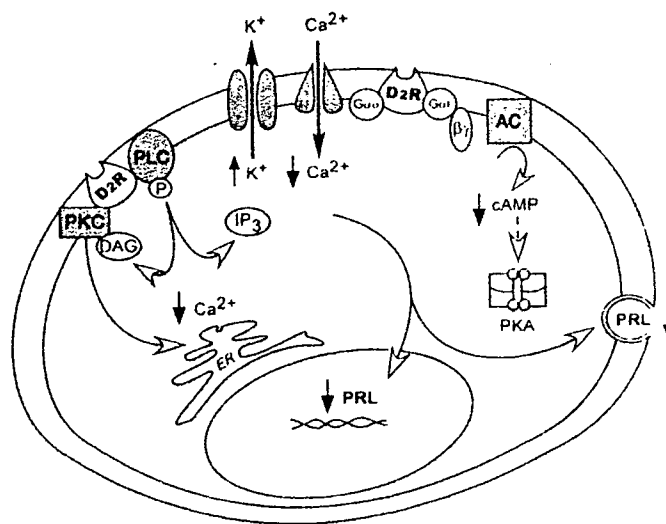
La dopamina actúa a través de receptores específicos de membrana que se han subdividido según su distribución anatómica, características bioquímicas y respuesta farmacológica en dos tipos: los receptores  $D_1$  ( $D_1R$ ), que están acoplados a adenilato ciclasa (AC) y actúan a través de las proteínas Gs induciendo aumento de AMPc; los receptores  $D_2$  ( $D_2R$ ), que no se

acoplan a AC o lo hacen a través de las proteínas  $G_i$  inhibiendo la síntesis de AMPc. En la adenohipófisis el receptor de dopamina identificado es el tipo  $D_2$  (Stoof, 1984) localizado en las células lactotropas, pero probablemente también está presente en otras células adenohipofisarias (Goldsmith, 1979) y en las células melanotropas del LI (Cote, 1982). Estudios previos han demostrado que la dopamina incrementa la expresión del  $D_2R$  en las células de adenohipófisis de rata (Johnston, 1993). También, diversos factores de crecimiento como el EGF y el NGF inducen la expresión del  $D_2R$  en las células lactotropas (Missale, 1991; 1993).

La dopamina es un reconocido inhibidor fisiológico de la liberación de PRL, cuyo mecanismo de acción implica diversas vías de señalización. La dopamina induce, en pocos segundos de exposición, la hiperpolarización de la membrana conduciendo a la inactivación de canales de calcio, reducción de calcio libre intracelular e inhibición inmediata de la liberación de PRL (Schofield, 1983; Gregerson, 2001). Este efecto podría estar mediado por el acoplamiento directo o indirecto del receptor a través de las proteínas  $G_o$  a canales de potasio, resultando en un descenso en el flujo de calcio (Figura 3). Además, el descenso de calcio intracelular podría estar provocado por la inhibición de la fosfolipasa C y la PKC, dando lugar a una disminución en la generación de  $IP_3$  y a la reducción de la movilización de calcio del retículo endoplásmico (Journot, 1987; Simmonds, 1985). Diversos estudios han establecido que la dopamina inhibe la actividad de la AC en adenohipófisis *in vivo*, y en cultivos de células lactotropas *in vitro* (Giannattasio, 1981; Lamberts, 1990). Como consecuencia produce una disminución de la generación de AMPc (Swennen y Denef, 1982) y la supresión de la actividad de la PKA. Este efecto media muchas de las respuestas celulares de la dopamina en las células lactotropas (Diamond, 1999), con algunas evidencias de la implicación también de la PKC (Chuang, 1993). El descenso de la concentración de DA en sangre portal implica una inmediata desaparición de su efecto inhibidor debido a que rápidamente se disocia de su receptor. Se ha descrito que la disociación de DA de su receptor es en sí mismo un mecanismo de señalización hormonal que estimula la liberación de PRL, siendo mediado a través de un aumento de

AMPC, pero también por la activación de la fosfolipasa C y la generación de  $IP_3$  (Martínez de la Escalera, 1992). *In vitro*, la retirada de DA induce de modo similar un rápido incremento en la liberación de PRL (Denef, 1984). Se ha desarrollado un modelo de regulación de PRL en la lactancia, según el cual la aplicación de este estímulo provoca inicialmente un descenso del tono dopaminérgico en el haz TIDA, pero que no resulta suficiente para reproducir el efecto global sobre PRL, siendo necesaria la cooperación inmediata, en un segundo paso de un PRF (Grosvenor, 1980).

La dopamina suprime además la expresión génica de PRL por un mecanismo que implica la reducción de los niveles de AMPC (Maurer, 1981; 1982a) (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de los mecanismos implicados en la regulación dopaminérgica de la célula lactotropa en la hipófisis.

Estudios previos han demostrado que la dopamina ejerce una acción anti-proliferativa sobre las células lactotropas (Arita, 1998). Recientemente se ha demostrado que esta acción es, al menos en parte, causada por la inhibición de la producción de AMPC (Suzuki, 1999). La bromocriptina, agonista del receptor de dopamina, causa una considerable reducción del tamaño de los

prolactinomas humanos. La utilización de mutantes del D<sub>2</sub>R origina un fenotipo con hiperprolactinemia e hiperplasia de las células lactotropas (Saiardi, 1997).

La regulación de la función de la célula lactotropa debe ser considerada en el contexto de un balance entre la acción inhibidora de la dopamina y de los numerosos factores hipotalámicos, periféricos y locales que actúan como estimuladores.

#### • GABA

La tipificación del neurotransmisor, ácido gamma-amino butírico (GABA) como un PIF (factor inhibidor de la liberación de PRL) se produjo al investigar la actividad no dopaminérgica del hipotálamo inhibidora de PRL, confirmándose que GABA actúa, tanto *in vivo* como *in vitro* inhibiendo la liberación de PRL (Schally, 1977). Mediante estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos se ha evidenciado que existe un sistema tuberoinfundibular gabaérgico (Vincent, 1982), que a través de la circulación portal permite la llegada de GABA a la hipófisis. Análisis con microscopio electrónico han detectado un abundante plexo nervioso gabaérgico en la zona externa de la eminencia media (Tappaz, 1984) y adyacente al espacio perivascular de los capilares portales. GABA se une a receptores específicos en la AH donde ejerce su acción (Grandison, 1979). El receptor predominante en las células lactotropas es GABA<sub>A</sub> (Apud, 1989).

La participación del sistema gabaérgico en la regulación fisiológica de la liberación de PRL es controvertida, y los efectos observados dependen de la vía de administración, la dosis y las condiciones experimentales de los animales.

#### • Serotonina

Estudios realizados *in vivo* han puesto de manifiesto el importante papel que la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) tiene sobre la liberación de las hormonas adenohipofisarias. Se ha confirmado el efecto estimulador de la serotonina sobre la liberación de PRL (Van de Kar, 1996).

Las neuronas serotoninérgicas originarias en los núcleos del rafe (principalmente en el núcleo dorsal) emiten las prolongaciones nerviosas a distintos núcleos hipotalámicos. El modelo admitido actualmente para explicar la acción serotoninérgica sobre la liberación de hormonas hipofisarias se fundamenta en que la 5-HT actúa como un modulador presináptico de neuronas hipotalámicas liberadoras de factores hipofisiotróficos. Sin embargo, la innervación serotoninérgica no se limita al nivel hipotalámico sino que llega a la hipófisis. En ésta no existe una distribución homogénea de los terminales serotoninérgicos sino que es el LI el que posee la más amplia y densa red de innervación (Léránth, 1983). Las fibras serotoninérgicas que llegan al LI lo hacen a través del tallo hipofisario, como lo demuestran los experimentos de sección del tallo hipofisario, en los que disminuye marcadamente la innervación serotoninérgica del LI (Friedman, 1983).

Se ha demostrado que la administración de la serotonina reduce los niveles de la dopamina en sangre portal hipofisaria (Pilotte, 1981). Numerosos trabajos señalan al NPV como el principal implicado en la regulación de PRL en diferentes situaciones fisiológicas como la lactancia (Kiss, 1986). El NPV contiene a su vez diferentes grupos de neuronas que liberan péptidos con actividad PRF y que incluyen a VIP (Mezey, 1985), TRH (Lechan, 1982), PHI, encefalina y OT. Todo ello permite suponer que el NPV es un área integradora de las señales fisiológicas que regulan la secreción de PRL. Por ejemplo, la actividad serotoninérgica y vipérgica de este núcleo regula el ritmo circadiano de PRL (Arey y Freeman, 1990; 1992). Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que el estímulo directo de la 5-HT en la hipófisis, induce la liberación de PRL a través de una acción autocrina y/o paracrina de VIP (Balsa, 1998).

#### • TRH

TRH procedente del núcleo paraventricular del hipotálamo es secretada a la eminencia media (Brownstein, 1982). Su acción en la liberación de PRL ha sido bien establecida. TRH estimula la liberación de PRL de células lactotropas de manera dosis dependiente *in vitro* e *in vivo* (Tashjian, 1971). Estudios

previos han observado la elevación de los niveles de TRH en sangre portal en estados de aumento de la secreción de PRL, como la lactancia y el proestro (Fink, 1982). Sin embargo, sobre el papel fisiológico de TRH en la secreción de PRL existen ciertas controversias. Se ha demostrado, en nuestro grupo, que el efecto de TRH sobre la liberación de PRL se ejerce directamente sobre las células lactotropas, si bien puede estar parcialmente mediado a través de la acción autocrina y/o paracrina de VIP (Balsa, 1996a).

La acción de TRH se ejerce a través de receptores de membrana específicos localizados en las células lactotropas (Yu, 1998) e implica un aumento de liberación de la proteína y de la transcripción del gen de PRL (Murdoch, 1983). Una vez unido al receptor, TRH activa la fosfolipasa C, a través de las proteínas G, lo cual induce la generación de diacilglicerol (DAG) y de  $IP_3$  como segundos mensajeros (Aragay, 1992). DAG promueve la activación de la proteína quinasa C (PKC) y así entre otras acciones, potencia la exocitosis de PRL (Fomina, 1997); el  $IP_3$  media la movilización de calcio intracelular en las células lactotropas (Gershengorn, 1984).

#### • Oxitocina

Las dos principales hormonas liberadas por la NH, la oxitocina (OT) y la vasopresina (AVP), han sido implicadas en la liberación fisiológica de PRL. De ellas la mejor caracterizada como un PRF es la OT, que tanto *in vivo* como *in vitro* induce la liberación de PRL (Lumpkin, 1983; Liu y Ben-Jonathan, 1994). Ha sido bien establecida la liberación de OT en los vasos portales largos (Gibbs, 1984). Además, los vasos portales cortos conectan el lóbulo neural y la zona interna del lóbulo anterior, contribuyendo a un importante aporte de OT a la AH.

Recientemente el ARNm del receptor de la OT ha sido localizado en las células lactotropas (Breton, 1995). La OT parece ser un factor modulador importante en el aumento de PRL inducida por los estrógenos (Johnston, 1988). La OT puede, a su vez, mediar el efecto de VIP hipotalámico, ya que la administración intracarotídea de VIP induce liberación de OT y el tratamiento

previo con un antagonista de OT inhibe el aumento de PRL inducido por VIP (Samson, 1989).

- **Galanina**

La considerable presencia y específica distribución de neuronas galanina-positivas en el hipotálamo sugiere una importante función para este péptido en la regulación neuroendocrina de la secreción hormonal de la AH. Muchas de las fibras que llegan a la eminencia media proceden de la porción ventrolateral del núcleo arcuato (Merchenthaler, 1993). La concentración de galanina en sangre portal es mayor que en sangre periférica. Por lo tanto, la galanina reúne todos los criterios para ser considerada como una hormona hipotalámica-hipofisiotrófica (López, 1991).

Además, la galanina está abundantemente expresada en el lóbulo anterior de la hipófisis (Kaplan, 1988), sintetizándose principalmente en las células lactotropas. La galanina opera como un factor intrahipofisario que estimula la liberación de PRL tanto *in vivo* como *in vitro* (Koshiyama, 1987; Cai, 1998; Hyde, 1998). Se ha demostrado que la acción de galanina, media el efecto de TRH y VIP sobre la liberación de PRL, así como el efecto proliferativo de las células lactotropas inducido por los estrógenos (Wynick, 1998; Aihua, 1999).

- **Señales periféricas reguladoras de la función de la célula lactotropa**

- **Estrógenos**

Los estrógenos desempeñan un papel muy importante en la secreción de PRL a dos niveles. A nivel del hipotálamo, el estradiol modifica la actividad de las neuronas neuroendocrinas que controlan la secreción de PRL. Al nivel de la hipófisis, actuando directamente sobre la célula lactotropa, el estradiol controla la expresión génica de PRL y modifica su sensibilidad a estimuladores e inhibidores fisiológicos de la secreción de PRL.

Se ha visto que la dopamina disminuye su efecto inhibitor de la secreción de PRL cuando las células lactotropas están expuestas a estradiol *in vitro*



(Raymond, 1978; West, 1980) o *in vivo* (Leong, 1983). El estradiol ejerce este efecto por el descenso del número de receptores de dopamina (Raymond, 1978). Por otro lado, el estradiol potencia la sensibilidad de la célula lactotropa a TRH, por aumento del número de receptores de TRH (Giguere, 1982). El estradiol reduce la señal inhibitoria que el hipotálamo ejerce sobre la secreción de PRL. A largo plazo, el tratamiento con estradiol disminuye la concentración de dopamina en sangre portal hipotálamo-hipofisaria que llega a la adenohipófisis (Cramer, 1979). El tratamiento con estradiol disminuye la actividad tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de dopamina, en las neuronas del haz TIDA que llegan a la eminencia media (Blum, 1987; Pasqualini, 1991). Además, el aumento de PRL liberada en respuesta a estradiol, a través de un mecanismo de retroalimentación negativo, incrementa la actividad de estas neuronas dopaminérgicas y en consecuencia disminuye la secreción de PRL (Freeman, 2000).

En la adenohipófisis los estrógenos ejercen múltiples acciones: inducen hiperplasia de las células lactotropas (Gersten, 1970), regulan la expresión génica de PRL por unión a su receptor nuclear y al ADN induciendo la activación transcripcional del gen (Maurer 1982b; 1985; Waterman, 1988) y en consecuencia aumentan la síntesis de PRL y su contenido intracelular (Lieberman, 1982; Vician, 1979).

Hay estudios que han demostrado que los estrógenos en la adenohipófisis regulan la expresión y la liberación de factores locales, cuyas interacciones son muy importantes en la función de las células lactotropas. Se ha observado que los estrógenos regulan la expresión del ARNm de VIP (Lam, 1990), así como los niveles del péptido en la adenohipófisis (Pryor-Jones, 1988). También regulan la expresión y liberación de la galanina (Wynick, 1993) y la expresión de IGF-I en la hipófisis (Michels, 1993).

### •Glucocorticoides

Existe un amplio consenso sobre la inhibición de la secreción de PRL inducida por los glucocorticoides (GC). Es bien conocido que en ratas, los

niveles plasmáticos de PRL aumentan significativamente tras adrenalectomía, además el efecto de la adrenalectomía puede ser revertido por la administración de corticoesteroides (Chen, 1976; Brann, 1990). En modelos de estrés crónico los GC disminuyen los niveles plasmáticos de PRL (López-Calderón, 1989).

El efecto de los GC tiene lugar predominantemente dentro del sistema nervioso central. Así, la menor sensibilidad de las neuronas del haz TIDA, para inducir inhibición, por los elevados niveles de los GC podría ser responsable de la regulación de la secreción de PRL (Freeman, 2000). Además, se ha demostrado que los GC inhiben el efecto de VIP sobre la liberación de PRL (Rotsztein, 1981).

Aparte de la regulación de la secreción de PRL, los GC también influyen en la diferenciación (Sato, 1998) y la morfología (Carretero, 1997) de las células lactotropas. Se ha observado en cultivo que los GC reducen las áreas citoplasmáticas y nucleares de las células lactotropas.

### **\*Señales locales reguladoras de la función de la célula lactotropa**

La compleja maquinaria que regula la secreción de PRL, está también influida por mecanismos reguladores locales (Figura 1). Cada vez hay más evidencias que confirman que la adenohipófisis tiene una capacidad reguladora intrínseca, a través de señales autocrinas y paracrinas, y que este tipo de regulación puede afectar a la función de las células lactotropas (Ben-Jonathan, 1992; Schwartz, 2000).

A continuación, se describen brevemente algunos factores locales reguladores de la función de la célula lactotropa en la adenohipófisis.

#### **• IGF-I**

IGF-I es sintetizado en células de la hipófisis anterior. Su expresión dispersa y la distribución ubicua de su receptor en la AH, sugieren que pueda

desempeñar un importante papel local mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. Numerosos estudios han demostrado que IGF-I inhibe directamente la secreción de GH (Jones, 1995). Además, IGF-I incrementa la proliferación de las células corticotropas y lactotropas en ratón por un mecanismo autocrino o paracrino (Oomizu, 1998).

Se ha evidenciado en nuestro laboratorio que la exposición de las células adenohipofisarias a IGF-I aumentaba la expresión y la liberación de VIP. Además, se observó que el efecto de IGF-I sobre el aumento de PRL en el medio, está específicamente mediado por VIP a través de un mecanismo autocrino y/o paracrino (Lara, 1994).

#### • VIP

El VIP hipotalámico es un estimulador de la secreción de PRL, por lo tanto, su expresión en hipófisis (Arnaout, 1986), sugería que pudiera controlar localmente por un mecanismo paracrino, la regulación de PRL. Además, el ARNm de VIP se ha localizado en subpoblaciones de células lactotropas (Chew, 1996). Trabajos previos de nuestro grupo y de otros laboratorios han evidenciado que el VIP hipofisario está regulado por hormonas tiroideas, estrógenos, TRH y dopamina (Lam, 1989; Balsa, 1994) así como por factores locales (Lara, 1994).

VIP incrementa la secreción de galanina por las células hipofisarias (Wynick, 1993). Parece ser también, que el efecto de VIP sobre la liberación de PRL está mediado por la modulación de la galanina local secretada, que representa un importante regulador paracrino de las células lactotropas.

#### • EGF

EGF es un factor de crecimiento sintetizado en la hipófisis anterior (Mouihate, 1995). En ratas prepúberes la mayoría de las células productoras de EGF son LH-positivas (Mouite, 1996). La síntesis y la secreción de EGF, así como la expresión funcional de su receptor, está sujeto a regulación por estrógenos, cortisol, FGFb, TGF- $\beta$ , etc. Entre sus acciones, EGF promueve la

proliferación de las células corticotropas, la diferenciación de las células lactotropas (Childs, 1995; Felix, 1995) y estimula la expresión génica y secreción de PRL (Murdoch, 1982); además, se ha demostrado que estimula la secreción de ACTH y LH (Childs, 1991; Miyake, 1985).

- **NGF**

NGF es un factor sintetizado y secretado por células de la hipófisis anterior, expresado con mayor abundancia en las células somatotropas y lactotropas (Patterson, 1994; Missale, 1996). La estimulación con VIP (Missale, 1995) promueve la secreción de NGF. NGF podría tener un importante papel en la mitosis y diferenciación de las células de la AH (Proesmans, 1997), lo cual es relevante por la aparición de NGF y su receptor en la vida fetal.

Se ha propuesto que NGF hipofisario jugaría un papel dual: un papel local como estimulador de la diferenciación y proliferación de las células lactotropas durante el desarrollo hipofisario (Missale, 1995), y un papel sistémico como neurohormona que es cosecretada con PRL a la circulación. Además, NGF parece ser uno de los factores implicados en el mecanismo de desarrollo y progresión de los prolactinomas, ya que promueve la expresión del receptor de dopamina D<sub>2</sub> específico de las células lactotropas (Missale, 1994; 1998).

- **Galanina**

Es uno de los factores con acciones paracrinas hipofisarias mejor caracterizado. Se expresa abundantemente en la AH (Kaplan, 1988). Una serie de estudios han localizado galanina en las células somatotropas, tirotropas y lactotropas (O'Halloran, 1990). Recientemente, se ha identificado el receptor GALR2 de galanina expresado en la AH (Fahti, 1997).

Existe dimorfismo sexual en la expresión de galanina en la eminencia media y AH, donde su concentración es mayor en hembras (Gabriel, 1989). Los estrógenos son los reguladores predominantes de la actividad de galanina en la hipófisis, donde regulan positivamente los niveles del péptido y de su ARNm, así como el número de las células secretoras de galanina (Hsu, 1990;

Wynick, 1993; Hammond, 1997). Algunos estudios indican que el efecto de los estrógenos sobre la proliferación de las células lactotropas y la liberación de PRL estaría mediada por la galanina secretada localmente (Wynick, 1993; 1998; Cai, 1998). También se ha demostrado que la galanina mediaría el efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la secreción de ACTH (Cimini, 1996). Además, la galanina parece inhibir la secreción de gonadotropinas estimulada por GnRH (Todd, 1998).

- **subunidad- $\alpha$**

La subunidad- $\alpha$  de las glicoproteínas hipofisarias se sintetiza en la hipófisis, donde uniéndose a las subunidades- $\beta$  específicas de la TSH, LH y FSH dan lugar a las moléculas biológicamente activas. Estudios previos han evidenciado que la subunidad- $\alpha$  pueda tener una acción trófica (Van Bael y Deneff, 1996) e inducir la diferenciación de las células lactotropas durante la vida fetal y postnatal (Begeot, 1984; Seuntjens, 1999). En nuestro laboratorio se ha demostrado que, en cultivos de células hipofisarias de rata, el IGF-I aumenta la expresión génica de la subunidad- $\alpha$  (Pazos, 1995), sugiriendo que la subunidad- $\alpha$  podría ser mediadora de ciertas acciones de IGF-I en la regulación de PRL. Además, se ha observado que en la hipófisis de rana, las células lactotropas pueden sintetizar y secretar subunidad- $\alpha$  (Oguchi, 1996).

- **Sustancia P**

La presencia de sustancia P se ha detectado en la AH (Morel, 1982b). Es secretada por diferentes células hipofisarias como las tirotropas y las somatotropas (Arita, 1994). La sustancia P ha sido asociada con la secreción de GH y PRL (Kato, 1976). Más recientemente, se ha visto que la sustancia P y VIP interaccionan a nivel de mecanismos de señalización en las células lactotropas (Mau, 1997). Otros trabajos indican que la sustancia P local también influye en la secreción de las gonadotropinas (Shamgochian, 1992).

- **TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  es un miembro de una familia de factores de crecimiento que regulan la diferenciación y la proliferación celular de una amplia variedad de tejidos incluyendo la AH. Se ha demostrado la presencia de TGF- $\beta$ , así como su receptor en las células lactotropas, (Sarkar, 1992). TGF- $\beta$  suprime la proliferación de las células lactotropas y disminuye la síntesis y secreción de PRL (Murata, 1991; Minami, 1997; Abraham, 1998).

En ratas con tumores inducidos por estrógenos, la proteína y el ARNm de TGF- $\beta$  y su receptor están disminuidos (Pastorcic, 1995). Estos datos sugieren la posibilidad de que la tumorigénesis podría ser, entre otras, el resultado de la supresión de la actividad TGF- $\beta$ .

## **2. FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA**

En 1972 Daughaday denominó "somatomedinas" a diversos péptidos que, posteriormente, se denominarían factores de crecimiento similares a la insulina o IGFs (Daughaday, 1972). Estos factores de crecimiento, sus receptores y sus proteínas de unión constituyen una familia de moduladores celulares que representan un papel esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo. En la actualidad existe una información exhaustiva sobre la biosíntesis, estructura del gen, estructura química y regulación, así como de la expresión y acciones en diferentes tejidos de los IGFs (Jones, 1995).

Estos péptidos, denominados factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II) son codificados por genes individuales, aunque relacionados ancestralmente con el gen de la insulina (Humbel, 1990).

### **2.1. Estructura**

El IGF-I maduro en humanos es un péptido de 70 aminoácidos, de cadena única, con tres puentes disulfuro intracatenarios. Presenta una homología estructural con el IGF-II de un 63% y con la proinsulina del 43% (Sara, 1990).

En la estructura del péptido maduro se han caracterizado determinadas secuencias o dominios con significación funcional que se denominan dominios B (aa 1-29), C (aa 30-41), A (aa 42-62) y D (aa 63-70) (Cooke, 1991). Se han identificado en los dominios C y D los sitios de mayor afinidad por el receptor tipo I (Bayne, 1989), mientras que el dominio B se caracteriza por su capacidad de unión a sus proteínas transportadoras (Cascieri, 1988).

El gen que codifica para IGF-I es un gen único compuesto por seis exones separados por cinco intrones de un tamaño de 1,9 a 50 Kb (Adamo, 1993). Los exones 1 ó 2 codifican el péptido señal y una región 5' no traducida; estos exones sufren un acoplamiento alternativo con el exón 3, el cual codifica el resto del péptido señal y la mayoría del dominio B (Lowe, 1987). El exón 4 codifica el resto de los dominios B, C, A y D y los 16 primeros aa del péptido E. El exón 5 codifica parte del péptido E, y el exón 6 el resto del péptido E y una secuencia de la región 3' no traducible. Los mecanismos moleculares del control de expresión del gen de IGF-I se producen por la existencia de varios sitios de inicio de la transcripción y el acoplamiento alternativo del transcrito primario de IGF-I.

IGF-I es sintetizado como pre-prohormona (Daughaday, 1989) conteniendo el péptido señal, que varía en función de la transcripción del exón 1 y 2. Actualmente se admite que la transcripción del exón 1 y del exón 2 está controlada por distintas secuencias promotoras probablemente cercanas a cada uno de los exones (Adamo, 1993), que se regulan de forma diferente durante el desarrollo y por las distintas señales hormonales. La pre-prohormona es procesada a prohormona que contiene diferentes tamaños del llamado péptido E. El péptido E depende del acoplamiento alternativo del exón 5, en el extremo 3', el cual codifica dos secuencias diferentes del péptido E. El ARNm de IGF-I con ausencia de la secuencia del exón 5 codifica para el péptido E tipo A (ARNm de IGF-I), y el ARNm de IGF-I que contiene las 52 bases del exón 5 codifica para el péptido E tipo B (ARNm de IGF-I) (Lowe, 1988).

## 2.2. Distribución anatómica

La expresión del gen de IGF-I es muy ubicua, habiéndose detectado su ARNm en hígado, pulmón, riñón, timo, bazo, corazón, músculo, esquelético, ovario, útero, testículo, cerebro, glándula mamaria, intestino, pared vascular y otros (Murphy, 1987; Hernández, 1989).

En el sistema nervioso central, IGF-I está ampliamente distribuido tanto en el animal adulto como durante el desarrollo embrionario (García-Segura, 1991; Langford, 1993).

En hipófisis humana, las células que contienen IGF-I presentan una distribución dispersa dentro de la glándula (Ren, 1994). En hipófisis de rata, se ha demostrado que el ARNm de IGF-I se distribuye de forma irregular y difusa, aunque se localiza preferentemente en células con características morfológicas e inmunocitoquímicas propias de las células folículo-estrelladas. El ARNm del receptor (IGF-I R) está distribuido abundante y homogéneamente por toda la AH y el lóbulo intermedio (Bach, 1992). En ratón, la proteína y el ARNm de IGF-I han sido localizados en las células somatotropas y el ARNm del receptor en las células corticotropas y somatotropas por hibridación *in situ* (Takahashi, 1997).

Recientemente se ha demostrado la presencia de IGF-I en gránulos secretores en coexistencia con PRL en *Xenopus laevis* (David, 2000). Además, en líneas tumorales hipofisarias (células GH3), las células expresan IGF-I (Fagin, 1987).

Por lo tanto, la presencia uniforme de IGF-I y la distribución de su receptor por toda la hipófisis anterior, apoyan el importante papel local que desempeña mediante mecanismos autocrinos y paracrinos.



## **2.3. Regulación de la expresión de IGF-I en la hipófisis**

Tanto la expresión del ligando IGF-I, como la de su receptor, están sometidas a una regulación multifactorial. Factores hormonales y nutricionales, regulan la expresión del sistema IGF-I de forma muy específica relacionado con el tipo de tejido y el estadio del desarrollo (Rotwein, 1993).

Hay diversos estudios de interés sobre la regulación génica y la síntesis de la proteína de IGF-I, así como su receptor (IGF-I R) en la AH. IGF-I ejerce un efecto de autorregulación negativa a nivel hipofisario e hipotalámico a través de la GH. Los estrógenos producen un incremento tanto del contenido del péptido como de la transcripción de su gen y del gen de su proteína transportadora, IGFBP-2, sugiriendo un posible papel de IGF-I como mediador de los efectos de estrógenos en la hipófisis, incluyendo la hiperplasia de la AH (Michels, 1993).

## **2.4. Acciones biológicas**

IGF-I es un factor de crecimiento que es sintetizado en la hipófisis donde actúa localmente. Numerosos trabajos han evidenciado diversas acciones de IGF-I en la hipófisis. Estas acciones incluyen efectos directos de IGF-I sobre la proliferación celular de las células secretoras y la síntesis y secreción de hormonas hipofisarias.

Diversos estudios han demostrado que IGF-I inhibe directamente la secreción de GH (Yamasaki, 1991; Jones, 1995). Además de este efecto, hemos observado en nuestro grupo, que IGF-I induce la expresión génica de VIP y su secreción en la hipófisis (Lara, 1994).

IGF-I es un importante factor mitogénico (Conover, 1985) que además previene la apoptosis en diversos tipos celulares (Dudek, 1997; Párrizas, 1997a; Pugazhenthí, 2000). Para un mejor entendimiento, a continuación se explicarán estas acciones detalladamente.

### **2.4.1. Acción proliferativa**

Estudios previos han mostrado que IGF-I de origen hipofisario incrementa la proliferación de las células corticotropas y lactotropas en ratón por un mecanismo autocrino o paracrino (Takahashi, 1997; Oomizu, 1998). Además, se ha visto que la insulina presenta acciones mitogénicas en las células lactotropas, a través de la vía Ras/MAPK, lo que sugiere la posible mediación de sus acciones a través del receptor de IGF-I (Suzuki, 1999). Datos recientes demuestran que ratones con disrupción del gen de IGF-I, presentan disminución en el número de las células lactotropas (Stefaneanu, 1999). Además, en células tumorales hipofisarias, GH3, IGF-I es necesario para su proliferación (Hayashi, 1984).

Se ha sugerido que el IGF-I podría mediar los efectos proliferativos de los estrógenos sobre las células lactotropas, dado que la administración de estrógenos incrementa la presencia de IGF-I en la hipófisis (Michels, 1993). Además, se ha observado que en una línea celular secretora de PRL, GH4C1, el estradiol estimula la producción de IGF-I (Gilchrist, 1995).

Está ampliamente documentado el importante papel que tiene la activación de la vía de señalización Ras/MAPK sobre la proliferación celular inducida por IGF-I en diferentes tipos celulares (Foncea, 1997; Reiss, 1998; Coolican, 1997).

Además, IGF-I regula la expresión de genes de expresión temprana como c-fos y c-jun (LeRoith, 2001), por lo que se ha considerado que estos proto-oncogenes podrían mediar las acciones mitogénicas de IGF-I. Otro efecto que induce IGF-I, relacionado con su acción proliferativa, es la activación de genes implicados en el ciclo celular como las ciclinas D1, D2 y E en la fase G1, así como las ciclinas A y B en fases más avanzadas del ciclo celular (Reiss, 1998).

En diversos estudios se ha observado que IGF-I precisa de la interacción con otros factores de crecimiento para inducir la síntesis de ADN y la proliferación celular (Jones, 1995). IGF-I actúa como un factor de progresión, permitiendo la progresión de la fase G1 del ciclo celular y el inicio de la síntesis

de ADN (Stiles, 1979). Sin embargo, para que una célula salga de la fase G0 y entre en la G1 necesita la actuación de otros factores de crecimiento denominados factores de competencia (PDGF, FGFb, EGF...) los cuales aumentan la sensibilidad de la célula para responder a determinados factores de crecimiento. El tratamiento de las células con IGF-I, junto con uno de estos factores de competencia, permite la progresión por la fase G1 y la continuación del ciclo celular resultando en la síntesis de ADN y la proliferación celular (Jones, 1995). Además, los factores de competencia como PDGF estimulan la proliferación, al menos en parte, por la inducción de receptores de IGF-I, lo que aumenta la capacidad celular para responder a IGF-I y para progresar en el ciclo celular (Baserga, 1994). Otros estudios usando diferentes modelos celulares, sugieren que el AMPc podría actuar como factor de competencia del ciclo celular, y que facilitaría la acción de IGF-I para promover la proliferación celular (Tramontano, 1988; Yamamoto, 1996; Kimura, 2001).

#### **2.4.2. Acción anti-apoptótica**

Las acciones de IGF-I sobre el proceso de apoptosis así como su mecanismo de acción han sido ampliamente documentados.

En células hipofisarias de *tilapia* se ha demostrado que IGF-I inhibe la apoptosis (Melamed, 1999). En otros trabajos se ha estudiado con más detalle el efecto de IGF-I sobre la muerte celular. En células PC12, se ha observado que IGF-I regula la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, vía activación PI3'-Kinasa/Akt (Pugazhenth, 2000). Apoyando estos datos, otros trabajos han demostrado que la quinasa Akt, activada por la PI3'-Kinasa, es un mediador crítico en la supervivencia celular inducida por IGF-I (Dudek, 1997; Datta, 1997). Dada la complejidad de la maquinaria apoptótica, Akt podría promover la supervivencia e inhibir la muerte celular por diversos mecanismos. Akt podría bloquear la apoptosis regulando la expresión o la actividad de miembros de la familia Bcl-2, o de proteínas de la familia de las caspasas (Datta, 1999).

### • Componentes moleculares del programa apoptótico

La base para la comprensión del proceso de la apoptosis en mamíferos procede en gran parte de estudios genéticos en *C. elegans*, que han identificado una serie de genes que controlan la muerte celular (Horvitz, 1999). Ced-9 y egl-1 de *C. elegans* se han relacionado en mamíferos con Bcl-2, el cual es el prototipo de una gran familia de proteínas relacionadas estructuralmente y que regulan la muerte celular en mamíferos (Reed, 1998). Algunas de esas proteínas, como Bcl-2 y Bcl-xL, promueven la supervivencia celular, mientras que otras proteínas de esta familia, como Bax y Bad, promueven la apoptosis.

La actividad de los miembros de la familia Bcl-2 está regulada en parte por su capacidad para formar homo- y heterodímeros. Diversos miembros de la familia Bcl-2 están localizados en las membranas de ciertos orgánulos como el núcleo, el retículo endoplásmico y la mitocondria (Krajewski, 1993). Diferentes estudios han demostrado un papel clave de la mitocondria en la apoptosis, y especialmente en la relación con la función de las proteínas de la familia Bcl-2 (Zhu, 1996). Así, miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL suprimen la apoptosis en parte por el bloqueo de la liberación del citocromo C de la mitocondria, un paso crítico en la activación de las caspasas y la muerte celular (Franke, 1997). El desequilibrio entre proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas y la consiguiente formación de homo- o heterodímeros, determina la respuesta celular a un determinado estímulo.

## 2.5. Receptores y señales de transducción (Figura 4)

Las acciones biológicas de IGF-I en la hipófisis están mediadas por un receptor del tipo tirosina quinasa que se expresa en las células hipofisarias. El receptor de IGF-I (IGF-I R) se expresa en la membrana celular como un tetrámero, compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es totalmente extracelular y contiene una región rica en cisteína y 11 sitios potenciales de glicosilación. La subunidad  $\beta$  es una cadena

transmembrana con un dominio intracelular enzimático tirosina quinasa y un sitio de unión para ATP (Morgan, 1986). La homología más alta entre los receptores de IGF-I y de insulina reside en el dominio tirosina quinasa, mientras que la más baja se encuentra en los segmentos ricos en cisteína, pudiéndose explicar la especificidad de los receptores de IGF-I e insulina por sus ligandos (Werner, 1991). La capacidad de IGF-I, IGF-II e insulina de unirse a los distintos receptores hace que, *in vivo*, se puedan solapar las acciones biológicas de estos péptidos. Debido a esto, los IGFs pueden inducir hipoglucemia y la insulina puede presentar actividad mitogénica, cuando estos ligandos están presentes en concentraciones superiores a las fisiológicas.

La unión de IGF-I a su receptor induce la autofosforilación de múltiples residuos tirosina de la subunidad  $\beta$  de dicho receptor. Esta fosforilación del IGF-I R tiene dos distintos, pero relacionados resultados; primeramente, la actividad tirosina quinasa del receptor es potenciada y además, los residuos tirosina fosforilados proporcionan sitios de acoplamiento para varias proteínas que median la señalización del IGF-I R (LeRoith, 2000; 2001). Estudios previos han indicado que el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  une distintos sustratos proteicos que incluyen proteínas de la familia IRS (IRS-1, IRS-2), las cuales se asocian con el receptor a través de dominios PTB (phosphotyrosine binding), así como la familia de proteínas adaptadoras Shc (Butler, 1998; White, 1998). Después de la unión al receptor, esas proteínas son fosforiladas en los residuos tirosina, lo cual facilita que se les acoplen diferentes moléculas que conducen a la activación de las vías de señalización: la vía Ras/MAPK y la vía PI3'-Kinasa.

### **2.5.1. Vía de señalización de la MAPK**

Una vez fosforilado y activado IRS-1, puede unirse a Grb2 (Growth factor receptor binding protein-2). Por otro lado, el reclutamiento de las proteínas adaptadoras Shc al receptor activado conduce a una cascada de acontecimientos que incluyen la asociación de Grb2 con mSOS (proteína de intercambio de nucleótidos), la activación de Ras (pequeña proteína G

monomérica) y de Raf-1 (Voltek, 1993; Marshall, 1994). Una vez activada, la proteína Raf-1 activa mediante fosforilación, la MAPK quinasa (MAPKK) conocidas como MEK1 y MEK2 (Howe, 1992; Jaiswal, 1994) (Figura 4). MEK 1/2 tienen una actividad quinasa dual para Ser/Thr y Tyr con la que fosforilan a sus únicos sustratos conocidos, las proteínas MAPK/ERKs (proteínas quinasas activadas por señales extracelulares), que están altamente conservadas a lo largo de la evolución (Zheng, 1993; Dhanasekaran, 1998). ERK1 y ERK2 son proteínas Ser/Thr quinasas que fosforilan lugares ricos en prolina (Marshall, 1994). Una vez activadas, las MAPK/ERKs se traslocan al núcleo (Chen, 1992) donde, entre otros efectos, fosforilan y activan proteínas quinasas y una serie de factores de transcripción induciendo así la expresión de determinados genes (Treisman, 1996), como c-fos que son críticos para la proliferación y diferenciación celular (Segal y Greenberg, 1996).

La vía MAPK/ERKs es capaz de afectar a la expresión génica a través de la activación de proteínas quinasas. Así, ERK 1/2 puede fosforilar y activar a las proteínas quinasa ribosomales S6 (Rsk1, Rsk2 y Rsk3), las cuales están implicadas en la activación de factores transcripcionales como la proteína de unión al CRE (CREB) (Xing, 1996; 1998), el coactivador o proteína de unión a CREB (CBP) (Nakajima, 1996) y el factor de respuesta al suero (SRF) (Rivera, 1993), que regulan la transcripción de genes de expresión temprana inducida por factores de crecimiento. Además de controlar la actividad de los factores de transcripción, MAPK/ERKs podría regular la expresión génica mediante la regulación de cambios estructurales de la cromatina (Whitmarsh, 2000). ERK 1/2, a través de la activación de las quinasas Rsk2 y Msk1, fosforila la histona H3 y la proteína HMG-14 que aumentan la accesibilidad de los factores de transcripción a los lugares de unión al ADN (Thomson, 1999). Directamente, la vía MAPK/ERKs fosforila y regula la actividad de diversos factores de transcripción como Fos (Chen, 1993; 1996), Jun (Hibi, 1993), así como factores del complejo ternario (TCFs) como Elk-1 (Gille, 1995; Yang, 1998) el cual media la transcripción a través del elemento de respuesta al suero (SRE) presente en numerosos genes de expresión temprana.

La vía MAPK también promueve la síntesis de proteínas a través de la activación de la quinasa Mnk-1, la cual activa al factor iniciador de la síntesis de proteínas eIF-4E (Pearson, 2001).

Recientemente se ha demostrado que la vía MAPK controla directamente la síntesis de ADN y ARN (Graves, 2000). Este efecto se produce por la regulación de la enzima carbamoil fosfato sintetasa (CPS II), la cual cataliza la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina que permite la replicación de los cromosomas y el aumento de la expresión génica para inducir la síntesis de nuevas proteínas.

### **2.5.2. Vía de señalización de la PI3'-Kinasa**

Tras la fosforilación de IRS-1 en múltiples residuos tirosina por el receptor de IGF-I, se le une la subunidad reguladora p85 de la vía fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3'-Kinasa) (Backer, 1992), lo cual permite que p85 se una a la subunidad catalítica (p110) que conduce a la activación de la Ser/Thr quinasa Akt/PKB (Figura 4).

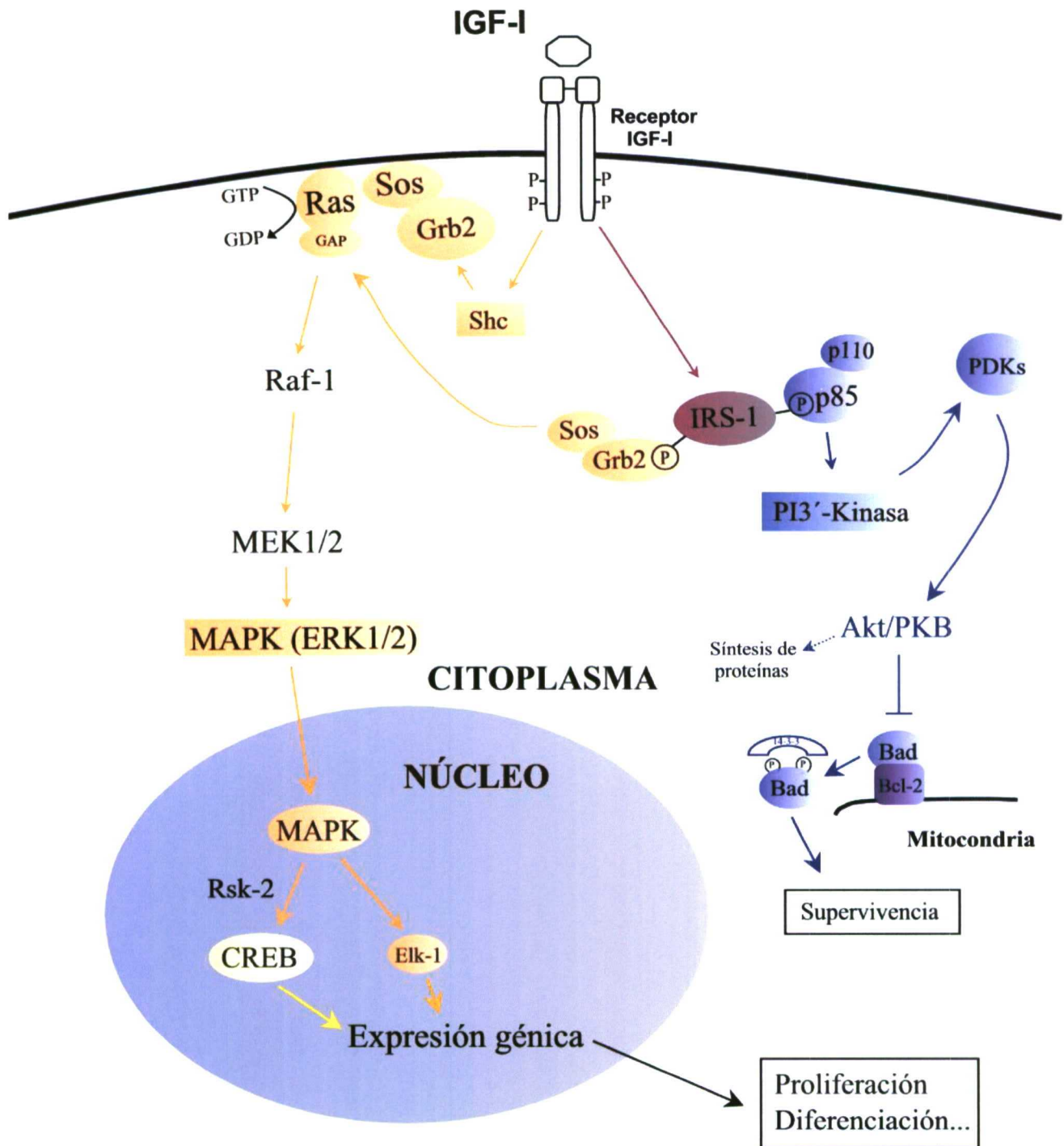
Estudios previos indican que la activación de la vía Akt/PKB, además de mediar los efectos metabólicos de IGF-I, protege a las células de la apoptosis (Downward, 1998). También, se ha sugerido que la vía PI3'-Kinasa podría mediar acciones proliferativas (Scrimgeour, 1997).

Como se ha comentado previamente, numerosos trabajos han demostrado que IGF-I, a través de la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt promueve la supervivencia celular (Dudek, 1997; Datta, 1997; Kulik, 1997). Además, Akt podría inhibir la apoptosis por la regulación de la expresión o la actividad de miembros de la familia Bcl-2. Este efecto se produciría directamente por la fosforilación de componentes de la maquinaria apoptótica o, indirectamente por cambios en los niveles de expresión de genes que codifican componentes relacionados con la apoptosis (Datta, 1999). Así, se ha comprobado que Akt promueve la fosforilación e inactivación de Bad y la caspasa-9, y regula la actividad transcripcional de miembros de la familia

“Forkhead” y NF- $\kappa$ B. Además, Akt bloquea la liberación de citocromo C de la mitocondria, lo cual podría reflejar un importante papel de Bad en la señalización de Akt (Kennedy, 1997; 1999).

Bad es un miembro apoptótico de la familia Bcl-2 que puede interaccionar e inactivar proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL (Zha, 1997). Los factores de crecimiento inducen la fosforilación de Bad en dos residuos, la serina 112 y la serina 136, lo cual promueve su disociación con las proteínas anti-apoptóticas y la asociación con las proteínas citoplásmicas 14-3-3. La asociación de Bad con las proteínas 14-3-3, la protegería de la defosforilación y la secuestraría lejos de la mitocondria. Algunos estudios han demostrado que Akt puede fosforilar Bad en la Ser<sup>136</sup>, lo cual conduce a su inactivación y promueve así la supervivencia celular (Datta, 1997; Del Peso, 1997) (Figura 4).





**Figura 4.** Vías de señalización del receptor de IGF-I.

### **3. PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)**

#### **3.1. Estructura**

El análisis de su estructura primaria muestra que VIP es un péptido altamente básico, formado por 28 aminoácidos y que está relacionado estructuralmente, con la secretina y, en menor medida, con el glucagón, el péptido inhibidor gástrico, el péptido histidina isoleucina amida (PHI) y el factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF).

El hecho de que la estructura primaria del VIP sea idéntica en la mayoría de las especies analizadas, indica que VIP se ha conservado fuertemente a lo largo de la evolución, y sugiere que gran parte de su cadena peptídica es esencial para su actividad biológica.

#### **3.2. Distribución anatómica**

El VIP es un péptido originariamente aislado de duodeno porcino y que posteriormente se ha demostrado que es sintetizado en numerosos tejidos del sistema nervioso central y periférico así como en la hipófisis. Concretamente en el hipotálamo, los núcleos con mayor número de somas neuronales que expresan VIP son el supraquiasmático (Card, 1981) y el paraventricular (Mezey, 1985). La existencia de fibras vipérgicas que parten de este último núcleo hacia la zona externa de la eminencia media y la identificación de VIP en sangre portal (Shimatsu, 1981; Lam, 1991) sugiere un papel neuroendocrino de este péptido.

Además de expresarse en el hipotálamo, VIP se sintetiza en adenohipófisis según se demostró por su presencia en tejido y en cultivos hipofisarios (Arnaout, 1986), así como de su ARNm (Segerson, 1989). Sin embargo, está poco claro en qué células es sintetizado. Se ha localizado VIP en las células lactotropas (Morel, 1982a) y su ARNm en una subpoblación de lactotropas (Chew, 1996). Otras células propuestas como posible fuente de VIP

han sido las células folículo-estrelladas (Segerson, 1989) y las células tirotropas (Jones, 1989).

### **3.3. Regulación de VIP en la hipófisis**

La síntesis y secreción de VIP en hipófisis están reguladas por la acción de factores hipotalámicos, periféricos y locales.

- **TRH**

Se ha demostrado que TRH incrementa la liberación de VIP en cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas hipotiroideas (Lam, 1989). En este estudio se describe también que GRF ejerce un efecto similar sobre la liberación de VIP. Además, en trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha visto que TRH incrementa ligeramente el ARNm de VIP (Balsa, 1996a).

- **Dopamina**

La dopamina (DA) y sus agonistas inhiben tanto la liberación de VIP como la transcripción de su gen, efecto que es necesario para manifestarse la acción inhibidora de DA sobre la transcripción y liberación de PRL (Balsa, 1994; 1996b). Además de afectar directamente a los niveles de VIP, diversos estudios han establecido que la DA afecta a su mecanismo de acción ya que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa en adenohipófisis *in vivo* y en cultivos de células lactotropas *in vitro* (Lamberts, 1990). Como consecuencia produce una disminución de la generación de AMPc en las células lactotropas (Swennen, 1982) y la supresión de la actividad de la PKA. Se ha visto que el mecanismo primario por el cual DA suprime la expresión génica de PRL es por la reducción de los niveles de AMPc (Maurer, 1981; 1982a). Se ha demostrado que la DA además de disminuir *in vitro* la liberación de VIP, inhibe la proliferación de células hipofisarias VIP-inmunoreactivas (Carretero, 1996).

## • Estrógenos

*In vivo*, la administración de los estrógenos induce un aumento del contenido en la adenohipófisis de VIP-inmunoreactivo y de sus niveles de ARNm (Pryor-Jones, 1988; Carrillo, 1992; Lam, 1990; Kasper, 1992). También se ha demostrado que tras el tratamiento con estrógenos aumentan los niveles de VIP en la eminencia media de rata (Pryor-Jones, 1988). Sin embargo, a nivel hipotalámico y en corteza cerebral los estrógenos no modifican el contenido de VIP ni los niveles de su ARNm. Además, se ha demostrado que el estradiol induce variaciones morfométricas y proliferativas en células hipofisarias VIP-inmunoreactivas (Carretero, 1995), lo cual sugiere que podría contribuir al efecto estimulador de los estrógenos sobre la secreción de PRL, la transcripción del gen de PRL y la proliferación de las células lactotropas.

## • Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas son quizás, de entre los factores estudiados, los que inducen mayores cambios de VIP. En ratas hipotiroideas se produce un aumento en los niveles de VIP-inmunoreactivo y de su ARNm en la AH (Segerson, 1989; Lam, 1989) y en el hipotálamo, a nivel del NPV (Toni, 1992). *In vitro*, las células adenohipofisarias extraídas de ratas hipotiroideas contienen y liberan más VIP que las procedentes de ratas eutiroideas (Lam, 1989) y en cultivos de neuronas corticales, como observamos en nuestro laboratorio, la adición de T<sub>3</sub> disminuye en una forma dosis-dependiente la liberación y el contenido de VIP (Lorenzo, 1992). Todo ello confirma que las hormonas tiroideas regulan la transcripción, el contenido y la liberación de VIP tanto en el sistema nervioso central como en la hipófisis.

## • Glucocorticoides

La adrenalectomía aumenta la transcripción del gen de VIP en adenohipófisis así como el contenido del péptido, mientras que no modifica la expresión ni el contenido de VIP en el hipotálamo; este efecto es además inhibido por el tratamiento con dexametasona (Lam, 1992), la cual abole la

acumulación de AMPc inducido por VIP y la liberación de PRL *in vitro*. Puesto que estos cambios son concordantes con los descritos en el caso de PRL, VIP podría mediar los cambios de PRL inducido por los GC a través de una modulación autocrina/paracrina.

- **IGF-I**

Además de la regulación de VIP hipofisario por señales hipotalámicas y periféricas, se ha demostrado una importante regulación a nivel local.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que IGF-I incrementa los niveles de ARNm, el contenido intracelular y la liberación de VIP en la adenohipófisis. En este estudio, IGF-I indujo cambios paralelos sobre la liberación y el contenido intracelular de PRL (Lara, 1994). Además se demostró que el efecto de IGF-I sobre la liberación de PRL está específicamente mediado por VIP a través de un mecanismo autocrino y/o paracrino. Debido al importante papel mitogénico de IGF-I en distintos tipos tejidos (Jones, 1995), se ha sugerido que ambos factores estén implicados en la hiperplasia de las células lactotropas.

### **3.4. Acciones biológicas**

VIP es generalmente reconocido como un neuropéptido con una extensa distribución en el SNC y periférico y con un amplio espectro de acciones biológicas. VIP actúa como un neurotransmisor o neuromodulador en la regulación de funciones vitales tan diversas como la digestión, reproducción o la inmunomodulación (Said, 1986). Además, se ha demostrado que tiene un papel muy importante en la proliferación celular, diferenciación, supervivencia neuronal (Muller, 1995), así como en la regulación de la liberación hormonal (Balsa, 1994).

Numerosos estudios han demostrado el importante papel que VIP desempeña en la **regulación de PRL**. *In vivo* e *in vitro*, VIP estimula la liberación de PRL actuando directamente a nivel hipofisario (Kato, 1978;

Enjalbert, 1980). Datos previos de nuestro laboratorio muestran que VIP tiene un efecto estimulador rápido sobre la liberación de PRL, que se pone de manifiesto tras una hora de exposición (Lara, 1991). La acción de VIP es directa sobre la célula lactotropa, como lo demuestra la presencia de receptores de VIP en estas células (Wanke, 1990), que inducen la estimulación de la adenilato ciclasa y el aumento de la generación de AMPc (Robberecht, 1979).

VIP es un importante regulador fisiológico de la liberación de PRL, como lo demuestran trabajos en los que la lactancia induce un aumento de la inmunopositividad de somas neuronales vipérgicas en el NPV (Mezey, 1985); estudios de inmunización pasiva, demuestran que el bloqueo de VIP bloquea la respuesta de PRL inducida por el proestro (Murai, 1989) y retrasa el comienzo de la liberación de PRL inducida por la lactancia (Abe, 1985). En trabajos previos hemos demostrado que VIP hipofisario media el efecto de otras hormonas o neurotransmisores implicados en la liberación de PRL (Balsa, 1994; 1998). Así, hemos observado que señales hipotalámicas como dopamina, TRH y 5-HT, pueden actuar modulando la liberación de PRL directamente y a través de VIP hipofisario aunque, en cada situación fisiológica puede predominar una u otra señal. El resultado final estará condicionado por otras señales periféricas como glucocorticoides, hormonas tiroideas y esteroides sexuales, así como señales locales. Por lo tanto, la acción autocrina y paracina de VIP cumple un papel esencial en la regulación de la secreción de PRL. Además, esta regulación es todavía más compleja al influir otros factores de la hipófisis como la galanina, la cual media la liberación de PRL inducida por VIP a través de una acción autocrina (Wynick, 1993).

VIP además de estimular la secreción de PRL, se ha visto que induce la expresión de PRL en líneas celulares hipofisarias GH3 y GH4C1 (Carrillo, 1985; Le Péchon-Vallée, 2000). Además, estudios previos han demostrado que el AMPc incrementa la síntesis de PRL y sus niveles de ARNm en cultivos de células hipofisarias (Maurer, 1982a). Estos datos sugieren que VIP, a través del aumento de AMPc y la activación de la PKA, regula la liberación de PRL y

la expresión de su gen. Además, la dopamina y sus agonistas modularían estos efectos en parte, por la regulación de VIP hipofisario (Balsa, 1996b) y por el bloqueo de la actividad de la adenilato ciclasa (Lamberts, 1990).

Varios estudios han demostrado que VIP tiene un papel importante en el control de la **proliferación celular, diferenciación y supervivencia** en el sistema nervioso (Muller, 1995; Pincus, 1990). A través de estas acciones, VIP, cuyos efectos se manifiestan en etapas tempranas de la ontogenia, podría ejercer acciones importantes en el SNC durante el desarrollo embrionario. En este sentido se ha demostrado que VIP tiene propiedades mitogénicas y tróficas sobre el tejido neural embrionario a través de múltiples mecanismos específicos de tejido y que implican distintos receptores de VIP (Gressens, 1993). Además, estos autores han mostrado que VIP promueve este efecto por el acortamiento de las fases G1 y S del ciclo celular (Gressens, 1998). En la hipófisis, se ha demostrado una acción de VIP sobre el crecimiento de células tumorales humanas (Pryor-Jones, 1989). Este efecto, junto al aumento de los niveles de VIP en la eminencia media e hipófisis durante el tratamiento con estrógenos, sugiere que VIP medie, al menos en parte, la hiperplasia de las células lactotropas inducida por estrógenos. Además, hay datos que indican que el AMPc tiene un importante papel estimulador de la proliferación de las células lactotropas (Suzuki, 1999).

La acción mitotrófica de VIP se potencia por la presencia de factores mitogénicos en el medio extracelular (Muller, 1995). Las distintas fases del ciclo celular están controladas por proteínas cuya regulación se encuentra bajo el control de factores tróficos. VIP induce genes de expresión temprana como c-fos, jun-B, c-jun... en diversos tipos celulares (Vaccarino, 1993; Jang, 1998). Además, trabajos previos han mostrado que el aumento intracelular de AMPc induce proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular y podría cooperar con otros factores de crecimiento en la proliferación celular (Roger, 1995; 1999; Kimura, 2001). Además, el AMPc puede actuar como un factor de competencia, facilitando la acción mitogénica de otros factores de crecimiento (Burikhanov, 1996). Este efecto podría producirse por un aumento de las

ciclinas D y E y un acortamiento de la fase G1 del ciclo celular (Yamamoto, 1996). En ciertas circunstancias, VIP podría estimular la proliferación indirectamente, mediante el control de la acción y la liberación de factores tróficos (Muller, 1995).

### **3.5. Mecanismo de señalización de VIP (Figura 5)**

Los mecanismos intracelulares que median las acciones de VIP podrían implicar varias vías de transducción activadas por los diferentes subtipos del receptor (Muller, 1995). En las células hipofisarias están presentes dos subtipos de receptores de VIP, VPAC1 y VPAC2 (Rawlings, 1996).

El mecanismo por el cual VIP inicia sus respuestas biológicas es a través de su unión a los receptores específicos presentes en la superficie de la membrana celular, que están acoplados a las proteínas G y activan la adenilato ciclasa (AC). Esta activación induce un aumento en la síntesis de AMPc y la activación de la PKA. La PKA una vez fosforilada se trasloca al núcleo donde fosforila y activa una serie de factores transcripcionales que regulan la expresión génica (Montminy, 1997) (Figura 5). Uno de los factores transcripcionales activados por la vía AMPc/PKA es CREB el cual regula la expresión de genes específicos que tienen en su promotor el CRE (Montminy, 1997; Shaywitz, 1999), algunos de los cuales están relacionados con la regulación del ciclo celular.

Estudios previos han demostrado que VIP estimula la liberación de PRL por el aumento de la generación de AMPc (Robberecht, 1979). Además, el AMPc induce la expresión del gen de PRL en cultivo primario de células hipofisarias (Maurer, 1982a). La dopamina modularía estos efectos, en parte por el bloqueo de la actividad de la AC (Lamberts, 1990), produciendo una disminución de la generación de AMPc (Swennen, 1982) y de la activación de la PKA.

Existen estudios recientes que indican que el AMPc no solamente activa la PKA. Se han identificado proteínas que se unen al AMPc que son factores

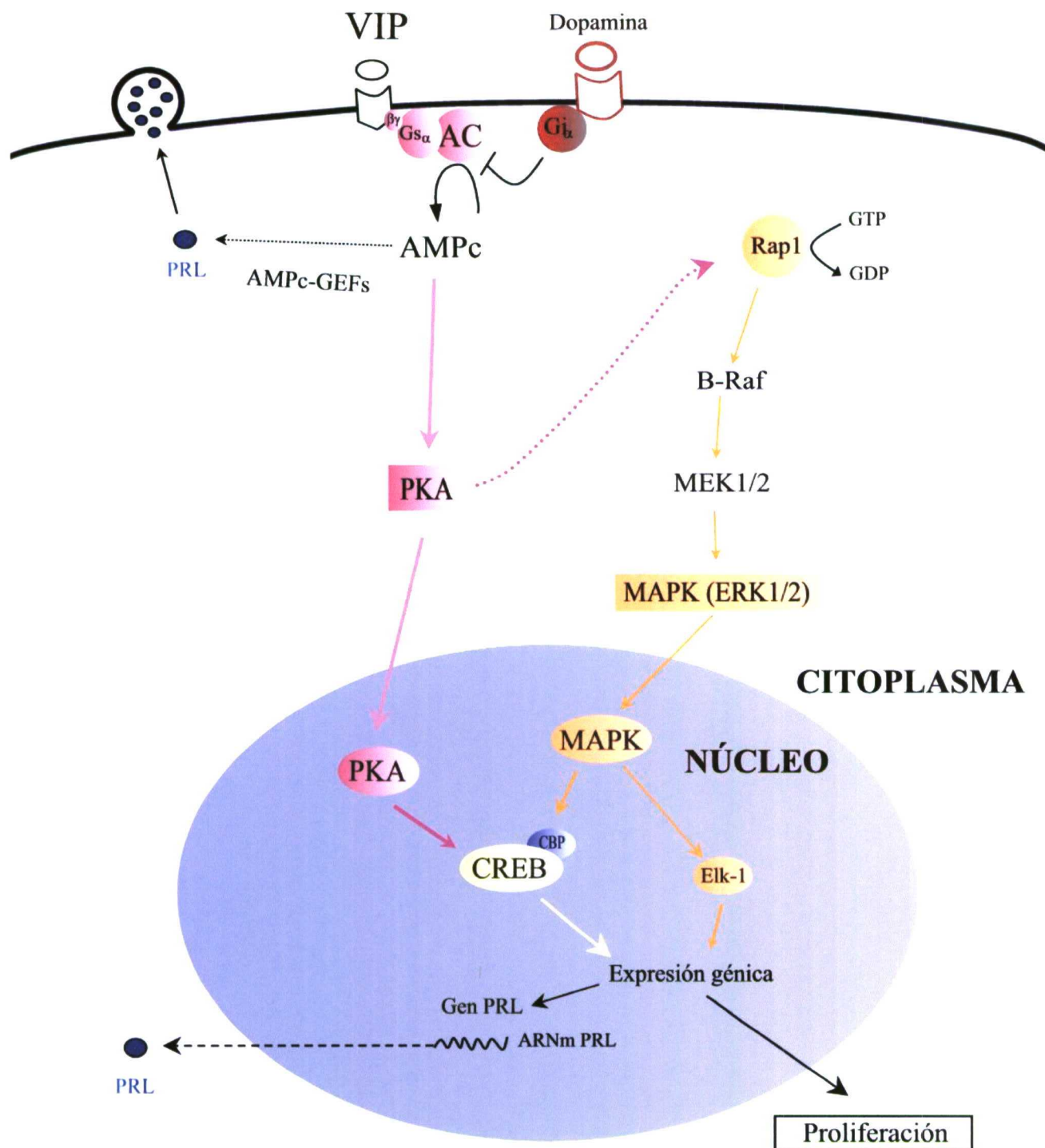


intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), los cuales abren nuevas vías de señalización en la acción del AMPc (Richards, 2001). Estos factores, en función del tipo celular y el estadio del desarrollo, promueven la activación de pequeñas GTPasas como Rap1, Rap2 y posiblemente Ras que conducen a la activación de vías de señalización que incluyen la p38MAPK y la PI3'-Kinasa. Recientemente, también se ha visto que en algunos tipos celulares, el AMPc podría controlar la exocitosis a través de estos GEFs (Ozaki, 2000).

Existen varios niveles de señalización cruzada entre la cascada del AMPc y otras vías. En algunos estudios se ha demostrado que la PKA activa selectivamente la vía MAPK/ERKs a través de Rap1/B-Raf (Vossier, 1997; Grewal, 2000a; Kievit, 2001), lo cual permite la fosforilación y activación de factores de transcripción específicos (Figura 5). Trabajos recientes realizados en una línea celular productora de PRL, GH4C1, han demostrado que VIP, a través de la PKA activa la vía MAPK (ERK 1/2) (Le Péchon-Vallée, 2000). Apoyando estos datos, en otra línea celular, GH3, la PKA se requiere para la activación de ERK 1/2 inducida por AMPc (Kievit, 2001). Este estudio indica que Rap1 tendría un papel importante en la mediación de este efecto.

La activación de la vía MAPK por la PKA, a través de Rap1, podría conducir a la activación de factores transcripcionales específicos o coactivadores que regulan la expresión génica. Así, se ha visto que el AMPc puede activar el factor transcripcional Elk-1 y regular la proliferación y diferenciación celular (Vossier, 1997). La PKA y MAPK están fuertemente implicadas en la activación del factor transcripcional CREB, y además estudios recientes han mostrado que la vía PKA-Rap1-ERK podría tener un importante papel en la regulación de la expresión génica controlada por CREB, a nivel de la estimulación y el reclutamiento de los coactivadores transcripcionales CBP y p300 (Grewal, 2000b; Kievit, 2001) (Figura 5). La regulación de esta vía de señalización podría tener un importante papel estimulador en la proliferación celular como se ha demostrado en las células PC12 (Vossier, 1997). En la línea celular hipofisaria, GH3, este mecanismo parece estar implicado en la

regulación de la expresión génica de PRL inducida por AMPc (Kievit, 2001; Yonehara, 2001).



**Figura 5.** Posibles vías de señalización del receptor de VIP en la célula lactotropa.

## 4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Las señales extracelulares conducen a la activación de una serie de moléculas de señalización intracelular, entre las que se encuentran las proteínas quinasas. Muchas de estas rutas de transducción de señales convergen en la activación de factores de transcripción, los cuales, una vez activados, se unen a sus elementos de respuesta específicos presentes en el promotor de ciertos genes modulando la transcripción de los mismos.

### 4.1. Factor transcripcional CREB

Uno de los factores transcripcionales activado por estímulos extracelulares mejor caracterizado es CREB (proteína de unión al CRE), el cual es crítico para una variedad de procesos celulares incluyendo la proliferación, diferenciación y supervivencia.

Estudios previos han demostrado que CREB regula la transcripción génica de numerosos genes, en respuesta a diversos estímulos (Shaywitz y Greenberg, 1999). La especificidad en la transcripción de un determinado gen es determinada por los factores y coactivadores que cooperan con CREB y la actividad de las vías que regulan esos complejos.

CREB es activado por una variedad de proteínas quinasas entre las que se incluyen la PKA y la MAPK. Estas quinasas pueden fosforilar CREB en un residuo particular, la serina 133 (Ser<sup>133</sup>) (Ginty, 1994; Xing y Greenberg, 1996; Montminy, 1997). CREB se une como un dímero al CRE (elemento de respuesta a AMPc) que se encuentra en los promotores de numerosos genes (Montminy, 1997) (Figura 6). Se ha visto que la fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) es crítica y necesaria, pero no suficiente para la inducción de genes de expresión temprana por factores de crecimiento (Ginty, 1994; Bonni, 1995). Parece ser que la activación y el reclutamiento de determinados coactivadores que se asocian a CREB, así como la interacción con otros factores de transcripción, regulan la capacidad de CREB para inducir la expresión de

genes específicos en respuesta a un estímulo determinado (Shaywitz y Greenberg, 1999).

Uno de estos coactivadores es la proteína nuclear CBP (proteína de unión a CREB), la cual se une específicamente a CREB fosforilado (Chrivia, 1993) (Figura 6). CBP actúa como un adaptador permitiendo la unión y la estabilización de CREB a la maquinaria transcripcional (Kwok, 1994). Además, CBP contribuye al reclutamiento de la RNA polimerasa II (Pol II) (Nakajima, 1997) y facilita el desenrollamiento del ADN para permitir que sea más accesible a la maquinaria transcripcional (Shaywitz, 1999).

Estudios recientes muestran que es probable que las acciones de diferentes señales contribuyan a la expresión génica regulada por CREB. Se ha visto que la vía AMPc/PKA requiere la vía MAPK (ERK 1/2) para la activación y el reclutamiento de CBP (Grewal, 2000b).

En algunos casos, hay factores de crecimiento que para inducir la transcripción requieren que CREB coopere con otros factores de transcripción. Se ha demostrado que para activar la transcripción de c-fos en las células PC12, CREB requiere al SRF (factor de respuesta al suero) unido al SRE (elemento de respuesta al suero) (Bonni, 1995).

Es también importante la cinética de activación de CREB, pues permite la regulación de distintos programas de expresión génica dependiendo del estímulo. Se ha visto que la sostenida fosforilación de CREB podría facilitar que CREB coopere con productos proteicos específicos de los genes de expresión temprana y así promover la activación de determinados genes de expresión tardía que tienen en sus regiones reguladoras zonas de unión a estos factores transcripcionales (Bonni, 1995).

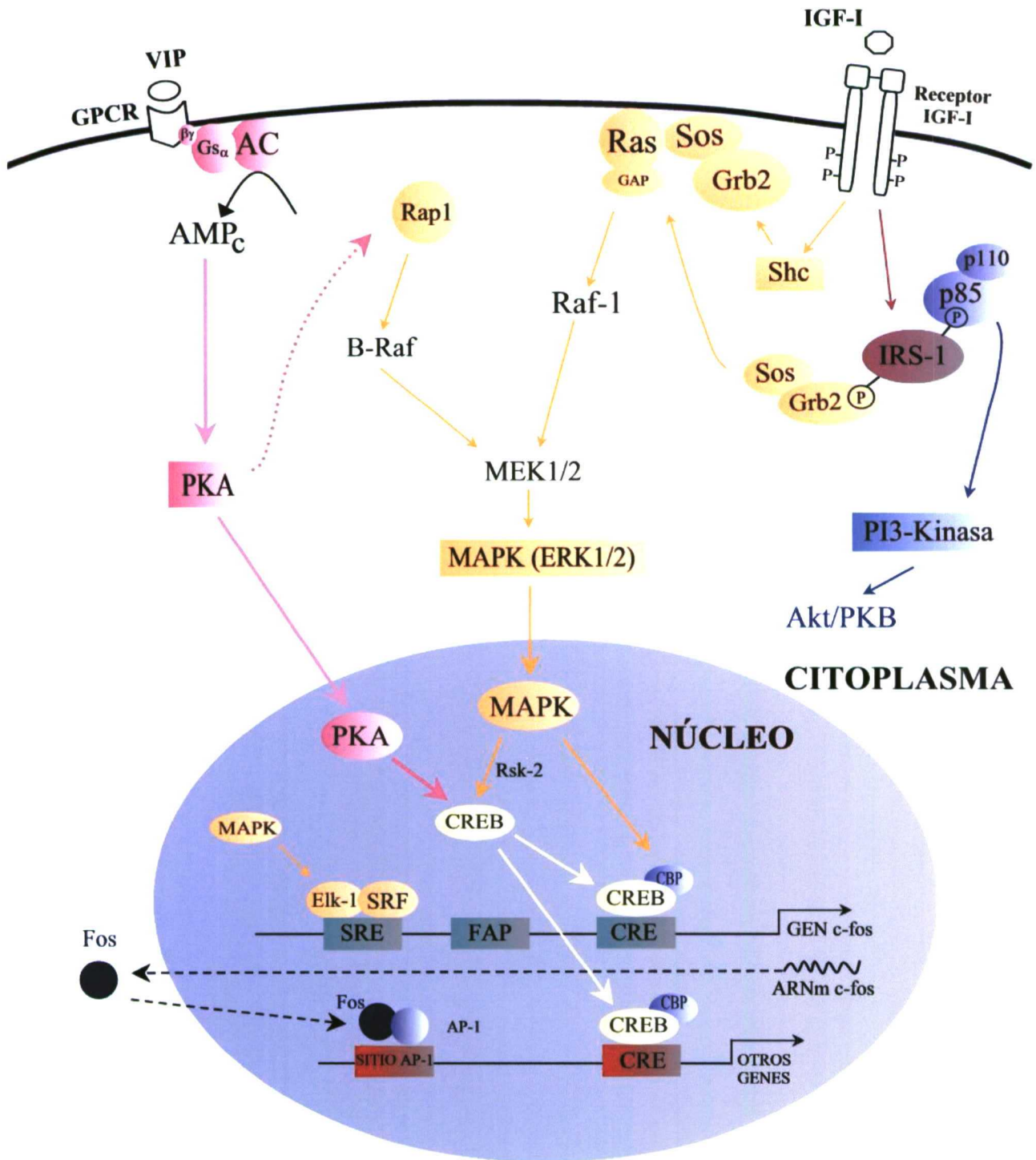
Por lo tanto, el mecanismo por el cual CREB activa la transcripción y una respuesta celular específica, varía dependiendo del estímulo y estará determinado por la interacción con otros factores y coactivadores que cooperan con CREB, y por la actividad de las vías que regulan esos complejos.

## 4.2. Genes de expresión temprana

Los factores de crecimiento regulan la activación de múltiples factores de transcripción que contribuyen a la inducción transcripcional de genes de expresión temprana, como c-fos y c-jun que son críticos para la proliferación y la diferenciación celular (Segal y Greenberg, 1996), así como para la regulación de la expresión de determinados genes diana.

La inducción de los genes de expresión temprana ocurre rápidamente, transitoriamente e independientemente de la síntesis de nuevas proteínas. De los genes de expresión temprana, el mejor caracterizado es c-fos. Varios elementos reguladores localizados en el promotor de c-fos regulan su expresión. La secuencia CRE reconoce al factor transcripcional CREB, el cual puede ser activado por una variedad de proteínas quinasas, entre las que se incluyen la PKA y la MAPK/ERKs (Figura 6). La secuencia SRE, presente también en numerosos genes, reconoce a una proteína nuclear denominada SRF, que se expresa en la mayoría de los tipos celulares (Treisman, 1992). El elemento SRE es activado por la unión del SRF y de los factores del complejo ternario (TCFs) como Elk-1 (Bading, 1993). Estos factores son a su vez fosforilados y activados por la vía MAPK (Pearson, 2001).

Los proto-oncogenes c-fos y c-jun codifican los factores de transcripción Fos y Jun respectivamente, que son inducidos por estímulos externos. Estos factores se unen formando un complejo proteico junto con otros factores de transcripción, denominado AP-1 (proteína activadora-1) (Lee, 1988). El complejo AP-1 modula la transcripción de genes de expresión tardía, que contienen en su secuencia un sitio de unión AP-1 (Figura 6). Entre ellos se encuentran proteínas que regulan el ciclo celular como las ciclinas (Sherr, 1995), péptidos con funciones fisiológicas muy específicas como factores de crecimiento y sus receptores, enzimas que catalizan la síntesis de neuropéptidos... (Sheng, 1990).



**Figura 6.** Posibles mecanismos de señalización de IGF-I y VIP implicados en la expresión génica.

# OBJETIVOS



Como hemos expuesto en la Introducción, IGF-I y VIP son dos factores tróficos de gran ubicuidad que entre otras múltiples acciones biológicas, participan en el control de la diferenciación y proliferación celular. En estudios previos de nuestro laboratorio se había evidenciado que IGF-I y VIP estimulaban la liberación de PRL y que además el VIP tenía un papel permisivo facilitando la acción de IGF-I. A pesar de la importancia de estos factores en la regulación de PRL, es muy poco lo que se conoce sobre cómo su interacción puede contribuir a la regulación de la función de las células lactotropas. Por lo tanto:

El objetivo general del presente estudio era **profundizar en la regulación de PRL hipofisaria esclareciendo los mecanismos mediante los que IGF-I y VIP actúan, contribuyen e interaccionan en la regulación de la proliferación de las células lactotropas en la adenohipófisis**. Bajo esta perspectiva y, a la vista de los estudios previos, los objetivos concretos del presente trabajo son:

**1.- Estudiar la acción proliferativa de IGF-I sobre las células hipofisarias en cultivo primario.**

IGF-I es un factor mitogénico de muchos tipos celulares que se sintetiza en la hipófisis. En células tumorales hipofisarias, IGF-I promueve la proliferación de adenomas hipofisarios humanos y de una línea celular productora de PRL (GH3). Por todo ello, nos planteamos esclarecer la acción proliferativa de IGF-I sobre las células hipofisarias normales. Para este análisis se empleó como marcador de proliferación la incorporación de BrdU y los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

**2.- Definir la población de células hipofisarias sobre las que IGF-I y VIP ejercen su acción mitotrófica.**

Estudios previos han sugerido el posible papel de IGF-I como factor proliferativo de las células lactotropas mediando acciones de estrógenos. Además, en trabajos de nuestro laboratorio demostramos que IGF-I, en las

células hipofisarias de rata en cultivo, aumentaba los niveles de PRL en el medio de incubación a las 48 horas, sin modificar su expresión génica. Por lo tanto, ésta liberación inducida por IGF-I podría ser secundaria a un aumento en el número de las células lactotropas. Por otro lado, VIP es un neuropéptido que además de estimular la liberación de PRL, puede participar en la acción proliferativa inducida por estrógenos. Además, se ha demostrado una acción de VIP sobre el crecimiento de células tumorales humanas de origen hipofisario. Todo ello, nos llevó a analizar el papel de IGF-I y VIP en proliferación de células lactotropas. Para este análisis se empleó como marcador de proliferación la incorporación de BrdU y se estableció el tipo celular que proliferaba mediante el marcaje de células hipofisarias con anticuerpos específicos.

### **3.- Determinar si existe alguna interacción entre IGF-I y VIP en su acción proliferativa.**

Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que IGF-I estimula la expresión del ARNm de VIP en hipófisis, así como su liberación al medio. Además, la acción de IGF-I en el aumento de PRL en el medio, está mediada por la presencia de VIP. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que IGF-I y VIP interaccionen en su acción proliferativa. Para clarificar esta hipótesis, nos planteamos estudiar el papel de VIP como mediador de la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I, a través del bloqueo de VIP endógeno con antisuero específico.

### **4.- Estudiar los mecanismos de señalización intracelular que median la acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de células lactotropas.**

Las acciones proliferativas del IGF-I se ejercen, entre otras, a través de la vía de señalización Ras/MAPK, mientras que VIP ejerce sus acciones a través de la vía AMPc/PKA. Estudios previos han demostrado que la vía Ras/MAPK media la proliferación de las células lactotropas inducida por insulina, sugiriendo que este efecto se produce en parte a través del receptor de IGF-I. También se ha evidenciado el importante papel que tiene el AMPc en la

estimulación de la proliferación de las células lactotropas. Por todo ello, nos planteamos estudiar los mecanismos mediante los cuales IGF-I y VIP promueven la proliferación de las células lactotropas. Para comprobar la implicación de la vía Ras/MAPK, PI3'-Kinasa y AMPc/PKA en este efecto se utilizaron inhibidores específicos de estas rutas.

**5.- Estudiar la activación de las vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de IGF-I y VIP sobre las células hipofisarias.**

Dada la participación de la vía Ras/MAPK y AMPc/PKA en la proliferación de las células lactotropas, nos propusimos estudiar la activación de las vías de señalización implicadas en la acción de IGF-I y VIP sobre las células hipofisarias. Además, se intentó determinar si existía interdependencia entre las vías de señalización, mediante su bloqueo alternativo con inhibidores específicos.

**6.- Analizar la acción de IGF-I y VIP sobre la activación de factores transcripcionales.**

Estudios previos han demostrado que CREB es un factor de transcripción que es regulador crítico en la transcripción génica de numerosos genes. CREB es activado por la vía Ras/MAPK y AMPc/PKA, por lo que el objetivo inmediato fue analizar su posible activación por IGF-I y VIP. Además, se intentó estudiar si en las células lactotropas se producía dicha activación. Por otro lado, se planteó analizar si existía interdependencia entre las vías de señalización de IGF-I y VIP en la activación de CREB.

**7.- Estudiar el efecto de IGF-I y VIP sobre la activación transcripcional de genes cuya expresión está regulada por los elementos de respuesta SRE y CRE.**

Conocida la participación y activación de las vías de señalización de IGF-I y VIP, se propuso estudiar si la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE, podrían ser activados transcripcionalmente por estos factores. Además, se planteó analizar si a este

nivel existía interrelación entre las vías de señalización de IGF-I y VIP en la regulación de la expresión de estos genes.

**8.- Determinar una posible acción anti-apoptótica de IGF-I sobre las células hipofisarias en cultivo primario.**

Estudios previos han demostrado que IGF-I previene la apoptosis en diversos tipos celulares. Se intentó clarificar si en las células hipofisarias, IGF-I tenía efectos anti-apoptóticos mediados por la inducción de Bcl-2 y la fosforilación e inhibición de Bad. Además, estudios recientes han evidenciado que la activación de Akt/PKB, a través de la PI3'-Kinasa, media la regulación de la expresión de Bcl-2 por IGF-I. Por eso, se planteó analizar el mecanismo mediante el cual IGF-I ejercería esta acción.

Los resultados de estos estudios, así como la metodología empleada para su realización, serán expuestos a continuación.

# **MATERIAL Y METODOS**

## **I. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS HIPOFISARIAS DE RATA**

### **Material biológico**

Para el cultivo de células hipofisarias se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, de 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 250 gramos, procedentes de un criadero comercial (CRIFFA, Barcelona, España). Los animales permanecieron en nuestro laboratorio 24 a 48 horas antes de ser sacrificados por decapitación en ambiente estéril. Se seccionó la calota craneal, exponiendo la hipófisis tras apartar el encéfalo y, mediante pinzas estériles, se retiraron las membranas meníngeas que la cubrían y se diseccionó la neurohipófisis, obteniéndose los dos lóbulos adenohipofisarios, que fueron depositados en un tubo estéril que contenía solución salina de Hank's (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA).

### **Técnica del cultivo**

Una vez realizada la extracción y separación de las hipófisis se trasladó el material obtenido a una campana de flujo laminar, lavándose (x3) con una solución de Hank's para eliminar la presencia de hematíes y de posibles partículas no estériles que pudiesen depositarse durante el proceso de extracción, procediéndose finalmente a la dispersión celular. Para ello se incubaron las hipófisis durante 1 hora en 7 ml de una solución enzimática que contenía:  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (1,5 mg/ml), Papaína (1 mg/ml) (Merck, Darmstadt, Alemania), Proteasa Neutra (1mg/ml) (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, España) y DNAasa I (0,1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA), en una atmósfera de un 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ , saturada de humedad y a 37° C. Durante este período los tejidos se dispersaron cada 30 minutos haciéndolos pasar 5-6 veces por una pipeta Pasteur fina. Concluido este período de dispersión se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 750 rpm durante 5 minutos; tras decantación de los sobrenadantes se resuspendieron las células en 5 ml

de una solución de DNAasa I (1 mg/ml), realizándose una nueva incubación de 15 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Concluida esta segunda incubación, se centrifugaron de nuevo los tubos y, una vez decantados los sobrenadantes, se resuspendieron los precipitados de células en 5 ml de medio de cultivo, haciéndolos pasar 5-7 veces a través de una aguja de 22 gauges con el fin de disgregar individualmente las células. Las suspensiones celulares se diluyeron en nuevo medio de cultivo hasta alcanzar una concentración apropiada dependiendo del estudio a realizar:

- Para los estudios de proliferación, apoptosis y señalización celular, la concentración de células fue de  $10^6$  células/1,5 ml, que se sembraron en placas Petri de 35 mm (Corning Glass Work, Corning, NY, USA).

- Para los estudios inmunocitoquímicos las suspensiones celulares se diluyeron en medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de  $1,5 \times 10^5$  células/0,5 ml, realizándose la siembra en placas multipocillo (24 pocillos, Corning).

Todas las placas utilizadas en los estudios se trataron previamente con poli-L-Ornitina 0,015 mg/ml (Sigma) durante 16-20 horas. Posteriormente, se lavaron dos veces con agua destilada autoclavada y se dejaron secar en condiciones estériles hasta su utilización.

## **Medio de cultivo**

Los cultivos se realizaron en medio definido que consiste en DMEM con 1 g/l de glucosa (Biowhittaker), 3,7 g/l de sales de Hank's y 0,11 g/l de piruvato sódico, suplementado con: L-glutamina 200mM (Biowhittaker), BSA 1% (Sigma), HEPES 0,23% (Sigma), penicilina y estreptomicina 100U/ml (Biowhittaker), transferrina bovina 10  $\mu$ g/ml (Sigma), glucagón 10 pg/ml (Sigma), PTH 0,2 ng/ml (Sigma), corticosterona 0,1  $\mu$ g/ml (Sigma) y T<sub>3</sub> 0,5 nM (Sigma). A este medio se añadió 3% de suero fetal de ternera (FCS) (GIBCO, Invitrogen™, Life Technologies, Paisley, Scotland) sólo durante los periodos de

preincubación, no siendo utilizado nunca durante los procedimientos experimentos.

## **Procedimiento experimental**

Las células se preincubaron en el medio descrito, suplementado con 3% FCS, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, saturada de humedad y a 37° C. Setenta y dos horas después se retiraron los medios, se lavaron las placas o los pocillos con PBS estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, pH 7,4) calentado previamente a 37° C y, por último, se añadió nuevo medio definido libre de sueros y se incubaron las células durante el tiempo y en el ambiente previstos en cada diseño experimental.

Al final de cada experimento, las células se procesaron de diferentes formas, dependiendo del objetivo final del experimento y de acuerdo a las técnicas que a continuación se detallan. Los medios de incubación se recogieron acidificándolos con HCl 1N, se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm en frío durante 60 minutos, almacenándose los sobrenadantes a -20° C hasta su utilización en los RIAs.

## **II. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR GH4C1**

Para los estudios de transfección celular transitoria se empleó la línea celular hipofisaria de rata denominada GH4C1. La línea celular GH4C1 ha sido muy empleada para estudios de regulación de expresión génica en células hipofisarias y fue amablemente cedida por la Dra. Ana Aranda (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid).

### **Medio de cultivo**

Las células GH4C1 se crecieron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, en medio de DMEM con 4,5 g/l de glucosa (Biowhittaker) y 3,7 g/l de sales de Hank's, suplementado con: L-glutamina 200mM (Biowhittaker), HEPES 0,35% (Sigma),



piruvato sódico 1 mM (GIBCO), gentamicina 60 µg/ml (ICN, Pharmaceuticals Inc., CA, USA) y 10% de FCS (GIBCO).

## **Procedimiento experimental**

Las células GH4C1 se incubaron en el medio descrito en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, saturada de humedad, a 37° C. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, llevándose a cabo nuevos pases celulares cada cuatro o cinco días según la confluencia celular. Las células se despegaron de los frascos de mantenimiento mediante espátulas de plástico. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 750 rpm y las células resultantes se resuspendieron en medio de cultivo completo y se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer. A continuación las suspensiones celulares se diluyeron en nuevo medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de  $8 \times 10^5$  células/1,5ml, procediéndose finalmente a la siembra en placas Petri de 35 mm (Corning). Después de 24 horas de incubación se retiraron los medios, se lavaron las placas con PBS estéril y por último se añadió nuevo medio de cultivo, similar al anterior, libre de sueros para los estudios de transfección celular transitoria.

Al final de cada experimento, las células se procesaron para la realización de los ensayos de actividad luciferasa y β-galactosidasa.

## **III. RADIOINMUNOENSAYO**

### **RADIOINMUNOENSAYO DE PRL**

El contenido de PRL-IR en los medios de incubación se cuantificó por RIA con reactivos amablemente suministrados por el Dr. Parlow (NHPD, National Hormone and Peptide Program) del NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Maryland, USA).

## Marcaje radiactivo ( $I^{125}$ ) de PRL

En la iodación de la proteína se empleó una preparación de rPRL con referencia NIDDK-rPRL-I-5, siguiendo el método general descrito por Greenwood y Hunter (1963). A un pequeño vial se añadieron 50  $\mu$ l de tampón fosfato (0,5M pH 7,6), 2,5  $\mu$ g de rPRL en 25 $\mu$ l y 0,5 mCi de  $NaI^{125}$  (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). Se inició la reacción de oxidación añadiendo 7,5  $\mu$ g (10 $\mu$ l) de cloramina T (Merck) recién preparada. Tras agitar suavemente se paró la reacción de oxidación a los 20 segundos añadiendo 25  $\mu$ g (10 $\mu$ l) de una solución de metabisulfito sódico (Merck) recién preparada; posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de BSAc (Sigma) al 5%. Con el fin de separar la PRL- $I^{125}$  del  $I^{125}$  libre y de la BSAc- $I^{125}$ , la mezcla se cromatografió en una columna de Sephadex G-50 fino (Pharmacia, Upsala, Suecia) de 1x 45 cm equilibrada y eluída con un tampón fosfato 0,025 M (pH 7,6), BSAc 0,25% y azida sódica (Sigma) 0,1%. Se colectaron fracciones de 1,2 ml y las fracciones correspondientes a PRL- $I^{125}$  se mezclaron, alicuotaron y almacenaron a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización. Previamente a su utilización en el RIA, cada alícuota se repurificó en una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia) de 1x45 cm equilibrada y eluída en las mismas condiciones descritas anteriormente.

## Procedimiento del RIA

Todas las diluciones de las muestras, así como las correspondientes a las distintas concentraciones de la curva estándar se realizaron utilizando el tampón de ensayo, que fue el mismo empleado en la elución de las columnas de marcaje. Las concentraciones de la curva estándar se obtuvieron a partir de una solución concentrada de referencia NIDDK-rPRL-RP-3 y las empleadas fueron: 0,4; 0,8; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 ng/ml. En la realización del ensayo, para un volumen final de 1 ml, se añadieron 50 $\mu$ l de cada una de estas concentraciones o el mismo volumen de cada una de las muestras a valorar, 100  $\mu$ l de suero anti-rPRL diluido a 1:1.500 y 100  $\mu$ l de SNC (Calbiochem, La

Jolla, CA, USA) diluido a 1:120. Tras una incubación de 4 horas a temperatura ambiente, se añadieron 100  $\mu$ l (10.000 cpm) de rPRL-I<sup>125</sup> recién purificada realizándose una nueva incubación de 24 horas. A continuación se procedió a la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo, que se realizó por el método del segundo anticuerpo, añadiéndose 100  $\mu$ l de una anti-gammaglobulina de conejo obtenida en cabra (Calbiochem) y empleada a una dilución inicial 1:24. Cuando las muestras contenían inmunoglobulinas (experimentos realizados en presencia de antisuero), la precipitación se realizó añadiendo 100  $\mu$ l de proteína A de *Staphylococcus aureus* diluida a 1:10. Tras un segundo periodo de incubación de 24 horas en presencia del 2º anticuerpo o de la proteína A, se centrifugaron los tubos durante 1 hora a 3000 rpm, se aspiró el sobrenadante y se contó la radiactividad presente en los precipitados, utilizando un contador de radiactividad gamma (Packard Cobra Auto-gamma). Todas las muestras pertenecientes al mismo experimento se incluyeron en el mismo ensayo. La sensibilidad del ensayo fue de 0,4-0,8 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo 6% y 12% respectivamente.

#### IV. ANÁLISIS DE PROTEINAS POR WESTERN-BLOT

Para realizar estos estudios se utilizaron cultivos primarios de células hipofisarias, en placas de 35 mm de diámetro. El análisis del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (PC10) se realizó empleando un anticuerpo monoclonal específico anti-PCNA suministrado por DAKO (Barcelona, España). La proteína Bcl-2 (N-19) se detectó utilizando un anticuerpo policlonal específico suministrado por Santa Cruz Biothechnologies Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

##### Obtención de extractos celulares totales

Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS frío, se recogieron en PBS con la ayuda de una espátula de plástico, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 segundos y finalmente se incubaron con un tampón

de lisis (NaCl 0,1 M, Tris-ClH 0,01 M pH 7,6, EDTA 0,001M, NP-40 0,1%, aprotinina 1µg/ml y fluoruro fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100µg/ml) durante 15 minutos en hielo. La lisis se completó mediante una breve sonicación de 20 segundos. A continuación, los extractos celulares se centrifugaron a 14.000 rpm, durante 15 minutos a 4° C y el sobrenadante se guardó a -20° C hasta su utilización.

## **Cuantificación de las proteínas**

Con el fin de aplicar la misma cantidad de muestra en el gel, se procedió a la cuantificación de proteínas totales en cada muestra por el método de Bradford. La absorbancia a 595 nm se midió en un espectrofotómetro Genesys™ 5 (Spectronic™ Instruments, Inc., Rochester, NY, USA) y se empleó albúmina sérica bovina para construir la curva patrón.

## **Electroforesis y transferencia de las proteínas**

La preparación de los geles se realizó siguiendo los protocolos habituales para geles de proteínas (Laemmli, 1970). El método de electroforesis se basó en un sistema discontinuo donde los péptidos se empaquetan en un gel de alineación ("stacking") antes de entrar en el gel de separación lo que permite una excelente resolución.

En la preparación del gel de separación se mezcló la cantidad apropiada de poliacrilamida (30% acrilamida y 0,8% bis-acrilamida), para una concentración final del 10%, Tris-ClH 0,4M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato amónico (PSA) 0,1% y 10µl de TEMED. La solución del gel de alineación consistió en una mezcla más diluida de poliacrilamida al 3%, Tris-ClH 0,125M pH 6,8, SDS 0,1%. Los agentes polimerizantes PSA y TEMED se añadieron en último lugar.

Para la electroforesis se prepararon los extractos de proteínas (30-50 µg proteínas/muestra) igualando el volumen final con buffer de lisis y

posteriormente, añadiendo 6x tampón de carga (Tris-CIH 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 30%,  $\beta$ -mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 0,012%) para obtener una concentración final 1x. A continuación, se inactivaron las proteasas endógenas y se desnaturalizaron las proteínas manteniendo las muestras a 90° C durante 5 minutos antes de ser aplicadas al gel.

La electroforesis se realizó a 100 voltios en una cubeta SE 250 Mighty Small II (Amersham Pharmacia Biotech) en presencia de Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 1%.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Polyscreen<sup>R</sup> de PVDF (polivinil difluoruro) de Hybond<sup>TM</sup>-P (Amersham Pharmacia Biotech) mediante una corriente continua de 20 voltios aplicada durante 16 horas a 4° C. Se utilizó un tampón de transferencia que contenía: Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%.

## **Detección de las proteínas (Inmunoblot)**

Una vez transferidas las proteínas, se procedió a la detección de las mismas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello primero se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, con una *solución de bloqueo* (leche desnatada 5%, Tris-CIH 10 mM pH 7,5, NaCl 100mM, Tween-20 0,5%), con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica de la membrana. Posteriormente la membrana se incubó con el *primer anticuerpo* durante 1 hora, a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C (dependiendo del anticuerpo) diluido en Tris-CIH 10mM pH 7,5, NaCl 100mM, Tween-20 0,05% y leche desnatada 0,5%. Tras esta incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos en *solución de lavado*, (Tris-CIH 10mM pH 7,5, NaCl 100mM y Tween-20 0,1%), y posteriormente se procedió a la incubación de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, con el *anticuerpo secundario* específico conjugado con peroxidasa y diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. A continuación las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBS (NaCl 13,7 mM, KCl 0,27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,14 mM y

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,43 mM, pH 7,5). La detección de las proteínas se realizó incubando las membranas durante 5 minutos con el sustrato de la peroxidasa que se encuentra unida al anticuerpo secundario; de este modo se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz producida es capaz de impresionar una película de radiografía (Kodak, X-OMAT R, Rochester, NY, USA). Como sustrato de la reacción de quimioluminiscencia se utilizó el reactivo SuperSignal® Substrate WB (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Después de revelar la película, las bandas correspondientes a las proteínas específicas se digitalizaron con un analizador de imagen (Color Image Scanner, SEIKO, Japón) y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante su análisis densitométrico en un programa informático (Adobe Photoshop 2.0 y NIH-Image 1.47).

Para comprobar que la cantidad de proteína aplicada en cada pocillo era la misma se procedió al método de tinción de membranas (Current Protocols in Molecular Biology; John Wiley and Sons, Inc., NY, USA). Para ello se incubaron las membranas en solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 10%) durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con solución de tinción con azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 0,125%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante 4 horas con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó brevemente con solución de fijación y al final con solución de destinción (metanol 5%, ácido acético 7%) durante 2 horas y en agitación.

Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias, desestimándose aquellos valores para los cuales no había homogeneidad en la carga.

## **Detección inmunológica de las proteínas quinasas**

Después de cada tratamiento, se obtuvieron los extractos de proteínas totales siguiendo el protocolo descrito anteriormente excepto que se empleó el siguiente buffer de lisis: HEPES 50mM, pirofosfato sódico 10 mM, NaF 100

mM, EDTA 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton 1%, Glicerol 10%, PMSF 2 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml. La presencia de las formas activas de cada proteína quinasa objeto de estudio se analizó mediante Western Blot siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech).

Los anticuerpos primarios específicos utilizados en estos estudios fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/ 2) suministrado por Sigma; anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser<sup>133</sup>) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA); anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser<sup>473</sup>) suministrado por New England Biolabs (Ozyme, Francia) y anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Bad (Ser<sup>136</sup>) suministrada por Cell Signaling Technology™, Beverly, MA, USA). Como sustrato de la reacción de quimioluminiscencia se utilizó el reactivo ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech).

Con objeto de saber que los cambios observados en los niveles de la proteína fosforilada eran debidos a cambios en la fosforilación y no a diferencia de carga proteica, las membranas se lavaron con Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, Illinois, USA) durante 5 minutos a temperatura ambiente con objeto de eliminar los anticuerpos, y se incubaron en presencia de anticuerpos que reconocían específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de las proteínas quinasas respectivas. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-MAPK (ERK 1/ 2) (Sigma), anti-CREB (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA), anti-Akt (New England Biolabs) y anti-Bad (Cell Signaling Technology™). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias corregidas respecto a la señal de la banda de proteínas quinasas totales, que fue elegida como control de carga.

## Anticuerpos primarios empleados en el Western Blot

Anticuerpo	Dilución	Procedencia
PCNA(PC10)	1/10.000	DAKO
Bcl-2(N-19)	1/10.000	Sta. Cruz Biothecnology.
ERK 1/2-P	1/10.000	SIGMA
ERK 1/2	1/10.000	SIGMA
CREB-P (Ser <sup>133</sup> )	1/1.000*	Upstate Biothecnology
CREB	1/500*	Upstate Biothecnology
Akt-P (Ser <sup>473</sup> )	1/350*	New England Biolabs
Akt	1/1.000*	New England Biolabs
Bad-P (Ser <sup>136</sup> )	1/500*	Cell Signaling Technology
Bad	1/1.000*	Cell Signaling Technology

**Tabla 1.** Anticuerpos empleados para el análisis y cuantificación de proteínas por Western blot. \* Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C.

## V. TÉCNICAS CITOQUÍMICAS

### Fijación y preparación de los cultivos celulares

Para realizar estos estudios se utilizaron placas multipocillos (24 pocillos, Corning). Transcurrido el periodo de incubación, se retiró el medio y se procedió a lavar varias veces las células con PBS estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, pH 7,4) a temperatura ambiente. Posteriormente, se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 15 minutos a 4° C, y se lavaron en pases sucesivos de 5 minutos, con solución PBS, hasta eliminar todo residuo de fijador. A continuación las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos.

### Inmunocitoquímica

Para la detección de los distintos antígenos se emplearon técnicas de fluorescencia doble indirecta, de fluorescencia indirecta y no-fluorescencia y técnicas citoquímicas con fosfatasa alcalina.



**a) Método de fluorescencia doble indirecta.** Este tipo de técnica se empleó cuando se trataba de identificar dos antígenos diferentes con anticuerpos generados en distintas especies huéspedes.

Para el análisis de proliferación celular se empleó como marcador la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), el cual es un análogo de la Uridina que se incorpora en las células en división y puede ser detectado mediante un anticuerpo específico por técnicas inmunoquímicas (Gratzner HG, 1982). En los cultivos donde se quería detectar células lactotropas se utilizó un anticuerpo anti-rPRL (IC-5), suministrado amablemente por el NIDDK. El anticuerpo anti-rPRL (IC-5) no presenta reactividad cruzada con células ACTH-positivas de ratón y rata adulta, como lo ha comprobado y nos lo ha comunicado personalmente el Dr. Carl Denef. Para estudiar la incorporación de BrdU las muestras se incubaron con CIH 2 N para la desnaturalización del ADN durante 10 minutos a 4° C. Seguidamente las células se lavaron varias veces con PBS. Para evitar las reacciones cruzadas de los anticuerpos y las uniones inespecíficas, las preparaciones se bloquearon con una solución de PBS con un 5% de suero normal de cabra (DAKO). A continuación se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico que reconoce BrdU (DAKO) durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con inmunoglobulinas (IgGs) de ratón obtenidas en cabra y conjugadas con isocianato de fluoresceína (FITC, DAKO) durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las preparaciones con PBS, se incubaron con el segundo anticuerpo primario (anti-PRL) durante toda la noche a 4° C para detectar las células lactotropas que proliferaban. Este segundo anticuerpo primario fue visualizado empleando de nuevo la inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo secundario de conejo obtenido en cabra conjugado con tetrametilrodamina (Chemicon International, Tamecula, CA, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron lavadas nuevamente con PBS y montadas en portaobjetos en Mowiol (Aldrich, Sigma). El control de la posible reacción de cruce entre ambos marcajes fue realizado omitiendo el antisuero primario.

**b) Método de fluorescencia indirecta y no-fluorescencia.** Este tipo de técnica se empleó para la detección de formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>) (Upstate Biotechnology) y para la identificación del tipo celular en el cual se activaba este factor transcripcional.

Para la visualización del primer antígeno empleamos una técnica no-fluorescente incubando los cultivos con un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>) durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las células se lavaron con TBS pH 7,4 y se incubaron con inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cabra y conjugadas con Biotina (ZYMED Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) en TBS pH 7,6 durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las preparaciones con TBS, este anticuerpo secundario fue visualizado empleando DAB 0,05% (3,3'-diaminobenzidina, Sigma), Nitrato de níquel 0,08% (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,005%. Después de lavar las preparaciones se realizó la fluorescencia indirecta como se describe en el apartado anterior, para detectar el tipo celular en donde se fosforilaba CREB (Ser<sup>133</sup>). Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos en Mowiol (Sigma). El control de la posible reacción de cruce entre ambos marcajes fue realizado omitiendo el antisuero primario.

Las preparaciones obtenidas por esta técnica fueron destinadas para la identificación y cuantificación de las células inmunoreactivas para las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>), para PRL y las células inmunoreactivas para CREB-P y PRL conjuntamente. Estos datos permitieron determinar el índice de marcaje CREB-P/PRL:

\* CREB-P + PRL / PRL: indica el porcentaje de las células hipofisarias inmunoreactivas para ambos CREB-P y PRL del total de las células lactotropas contadas. El número de pocillos por cada grupo experimental fue de 3 ó 4. Cada experimento fue repetido al menos en 3 ocasiones.

**c) Inmunocitoquímica con Fosfatasa alcalina.** Este tipo de técnica se empleó para la detección de formas fosforiladas de ERK 1/2 (Sigma) de la vía

de señalización MAPK. Después de la incubación con el primer anticuerpo en TBS pH 7,4 durante toda la noche a 4° C, las preparaciones se trataron con inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra y conjugadas con fosfatasa alcalina (Chemicon) en TBS pH 7,6 durante una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo fue visualizado empleando Fast Red TR (Sigma). Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos en Mowiol (Sigma).

Las preparaciones obtenidas se emplearon para la detección de los tipos celulares inmunoreactivos para las formas fosforiladas de ERK 1/ 2 de la vía MAPK.

### **Análisis de proliferación celular: identificación de tipos celulares, cuantificación y determinación de los índices de marcaje**

Las preparaciones obtenidas por inmunocitoquímica fueron destinadas a la identificación de los tipos celulares y su cuantificación, lo cual permitió determinar los índices de marcaje.

Las preparaciones fueron fotografiadas empleando un microscopio de fluorescencia Nikon, Eclipse E400 (Tokio, Japón) equipado con filtros para detectar fluoresceína y rodamina. Para el fotografiado se empleó película Elite Chrome 400 (Kodak® Select). Empleando el microscopio se procedió a valorar el número de células hipofisarias inmunoreactivas utilizando el objetivo de 40X.

Para la cuantificación de proliferación celular se examinaron un mínimo de 30 campos / pocillo, calculando el número de células inmunoreactivas para BrdU, para PRL, y el número de células inmunoreactivas para BrdU y PRL conjuntamente. Estos datos permitieron determinar el índice de marcaje BrdU:

\*  $\text{BrdU} + \text{PRL} / \text{PRL}$ : indica el porcentaje de las células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas.

En todos los casos, el número de pocillos por cada grupo experimental fue de 3 ó 4. Cada experimento fue repetido al menos en 3 ocasiones.

## Anticuerpos primarios empleados en estudios inmunocitoquímicos

Anticuerpo	Dilución	Procedencia
BrdU	1/150	DAKO
PRL	1/4.000	NIDDK
CREB-P (Ser <sup>133</sup> )	1/100	Upstate Biothecnology
ERK 1/2	1/200	SIGMA

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios empleados para los estudios inmunocitoquímicos.

## VI. ESTUDIOS CON GENES INFORMADORES (REPORTER GENE ASSAYS)

### Vectores informadores utilizados

Como vector informador “experimental” se utilizó el vector de expresión pGL3-promotor (Promega Corporation, Madison, WI, USA) modificado (Lorenzo y cols, 1997). Este vector contiene el gen informador luciferasa bajo el control del promotor TK HSV mínimo. Los diferentes vectores informadores *cis* utilizados se obtuvieron clonando, en este vector básico (pGL3-Control), oligonucleótidos de doble cadena que contenían las secuencias consenso del elemento que responde al suero (SRE, CAGGATGTCCATATTAGGACATC, pGL3-SRE) y al AMPc (CRE, AGCCTGACGTCAGAGA, pGL3-CRE) (amablemente facilitados por la Dra. Lorenzo).

Como control de la eficiencia de transfección se utilizó el vector de expresión pRSV- $\beta$ -galactosidasa, que como su nombre indica contiene el gen que codifica a la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

## **Transformación, crecimiento bacteriano y extracción del ADN plasmídico**

Antes de comenzar con los estudios de transfección transitoria se amplificaron los vectores informadores descritos en el apartado anterior.

El primer paso para amplificar un vector consiste en transformar cepas bacterianas competentes con el ADN (vector) de interés. Para ello se incubaron bacterias competentes (Ultracomp™ Kit: INVαF', Invitrogen®, Life Technologies) en presencia de 1 µg de vector durante 30 minutos en hielo, tras lo cual se realizó un choque de calor, pasando los tubos a un baño que estaba a 37° C durante 4 minutos e inmediatamente después, se pusieron nuevamente en hielo durante 5 minutos. A continuación se añadió a cada tubo 1 ml de medio LB (bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, glicerol 0,5%) y se dejó durante 1 hora a 37° C en agitación, para que las bacterias se recuperaran y replicaran.

Posteriormente, se procedió a la selección de las bacterias que habían introducido el vector, mediante la siembra en placas de Petri previamente preparadas con medio LB suplementado con 1,5% de bactoagar y el antibiótico adecuado (ampicilina 100 µg/ml), al cual sólo son resistentes las bacterias transformadas. Se dejaron crecer durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se cogió una colonia y se procedió a su crecimiento. Primero se hizo un preinóculo en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina, durante 5-6 horas a 37° C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0,4-0,5 a una longitud de onda de 550nm. Se tomó 1 ml de cada tubo y se llevó a un matraz que contenía 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron crecer en las mismas condiciones descritas anteriormente durante toda la noche.

Al día siguiente, el contenido del matraz se vertió en botes de centrífuga que se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4° C, obteniéndose un precipitado de bacterias. La extracción de los vectores de las bacterias se

realizó según el método del QUIAGEN siguiendo el protocolo indicado en el Kit "QUIAGEN Plasmid Midi Kit Plasmid Purification" (QUIAGEN, Valencia, CA, USA).

## **Transfección transitoria mediada por lípidos**

La introducción de los diferentes vectores al interior de las células GH4C1 (transfección) se realizó siguiendo el protocolo indicado en el Kit de LIPOFECTAMINE™ Reagent (Invitrogen™, Life Technologies) adaptado a las condiciones de cultivo de la línea celular utilizada. La mezcla de lípidos suministrada está formada por un lípido neutro: dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) y un lípido catiónico (DOSPA) los cuales favorecen la entrada de ADN a través de la membrana plasmática.

Después de la dispersión celular, como se explicó en el apartado II, las células GH4C1 se resuspendieron en el medio de cultivo y se sembraron a una densidad de  $8 \times 10^5$  células/placa. Transcurridas 24 horas de preincubación, la *transfección* se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

En primer lugar se preparó la mezcla de transfección en tubos estériles de poliestireno diluyendo los vectores (2 µg pRSV-β-galactosidasa + 2 µg pGL3-Control o pGL3-SRE/CRE) en 250 µl de medio de cultivo libre de suero y antibióticos. A continuación, se añadieron 18 µl de Lipofectamina™ diluidos en 250 µl de medio de cultivo libre de suero y antibióticos, y se mezcló suavemente con la solución de ADN. Posteriormente, se dejó incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación, el medio de cultivo de las células se reemplazó por la mezcla de transfección añadida gota a gota. Después de 5-6 horas de incubación a 37° C, se añadió a cada placa 500 µl de medio de cultivo suplementado con un 20% de FCS pero sin antibióticos, incubándose durante toda la noche. Al día siguiente, las células se expusieron a los distintos

tratamientos durante 24 horas, tras lo cual las células se procesaron y se realizaron los ensayos de actividad luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa.

## **Detección de la actividad $\beta$ -galactosidasa *in situ***

Antes de realizar los ensayos de la actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa es conveniente saber si las células se han transfectado de forma correcta. Por lo tanto, en todos los experimentos que se realizaron, se pusieron dos placas controles que se utilizaron para determinar la eficiencia de la transfección mediante una técnica citoquímica que permite determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa *in situ*. Las células transfectadas con el vector control pRSV- $\beta$ -galactosidasa y que expresan la enzima  $\beta$ -galactosidasa se pueden visualizar mediante microscopía óptica ya que las células se tiñen de azul tras ser incubadas en presencia del sustrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-Galactosido (X-Gal).

Al final de cada experimento, las células se lavaron dos veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM, pH 7,3) y se fijaron en presencia de una solución de glutaraldehído (0,25% (v/v) de glutaraldehído en PBS) durante 15 minutos. A continuación, esta solución se eliminó y las células se lavaron de nuevo con PBS, tras lo cual se incubaron con una solución de X-Gal [0,2% de X-Gal (obtenida a partir de una solución stock al 2% de X-Gal en N-N-dimetilformamida),  $\text{MgCl}_2$  1 mM, NaCl 150 mM,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  3,3 mM,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  3,3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40mM] a 37° C durante un periodo de tiempo mínimo de 2 horas. Finalmente, la solución X-Gal se eliminó, se sustituyó por PBS y las células se observaron bajo el microscopio óptico.

Los ensayos de actividad luciferasa se realizaron sólo cuando la eficiencia de transfección fue superior al 5%.

## Ensayo de la actividad luciferasa

El ensayo de la actividad luciferasa se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual de "Luciferasa assay system" (Promega).

Al final de cada experimento, las células se lavaron con PBS y se recogieron en tubos eppendorf en presencia de un tampón de lisis (Reporter lysis buffer, Promega) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lisado celular se centrifugó a 14.000 rpm, durante 10 minutos a 4° C. Los sobrenadantes se recogieron en tubos nuevos para la determinación de proteínas por el método de Bradford y la cuantificación de la actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa.

El ensayo de actividad luciferasa se realizó tomando de cada muestra un volumen de 20  $\mu$ l. A continuación se añadió a cada muestra 100  $\mu$ l de reactivo de ensayo luciferasa (tricina 20 mM,  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,07 mM,  $\text{MgSO}_4$  2,67 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 33,3 mM, coenzima A 270  $\mu$ M, luciferina 470  $\mu$ M, ATP 530  $\mu$ M, pH 7,8), y se introdujeron las muestras en el interior de un luminómetro (TD-20/20 Luminometer TURNER DESINGS, Sunnyvale, CA, USA) el cual midió el pulso de luz producido en cada muestra durante 30 segundos a 25° C.

## Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa

Con objeto de normalizar la eficiencia de la transfección entre los diferentes experimentos y tratamientos se valoró, en cada una de las muestras, la actividad  $\beta$ -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico de Invitrogen®.

Un volumen de muestra de 20  $\mu$ l se mezcló con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 7,3,  $\text{MgCl}_2$  0,1 M,  $\beta$ -Mercaptoetanol 4,5 M, ONPG 4mg/ml (2-nitrofenol- $\beta$ -D-Galactopiranosido) y se incubó a 37° C hasta manifestarse la actividad enzimática por una reacción colorimétrica. El cambio de color en la muestra es



el resultado de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza el sustrato ONPG a o-nitrofenol que es de color amarillo. La reacción se paró añadiendo a cada muestra 150  $\mu$ l de  $\text{NaHCO}_3$  1 M. La eficiencia de transfección se cuantificó midiendo la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 410nm.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos se expresaron como el porcentaje de la actividad luciferasa / actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto al grupo control, el cual se estableció como el 100%.

## VII. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

### Producción del antisuero anti-IGF-I

El antisuero empleado para el estudio del bloqueo de la acción de IGF-I, se obtuvo en nuestro laboratorio por inmunización de conejos neocelandeses con IGF-I recombinante humano (Bachem, San Diego, CA, USA) ligado a albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) con carbodiimida (Abraham y Gover, 1991). Se hicieron reaccionar 1,7mg de IGF-I con 2mg de BSA en 4 ml de tampón fosfato ( $\text{PO}_4$ ) 0,05 M pH 7,6 en presencia de 16mg de carbodiimida. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 horas.

La suspensión de IGF-I-BSA se aplicó a los conejos mediante múltiples inyecciones subcutáneas repartida en dos dosis. En la primera dosis, el IGF-I ligado (0,5mg por conejo) se mezcló con adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, Michigan, USA) en proporción 1/1 (v/v) y con 4 mg por conejo de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). Además, cada conejo recibió 0,5 ml de una suspensión de antígeno de *Bordetella pertussis* (Difco) vía subcutánea. En la segunda dosis, cada conejo recibió 0,4 mg de IGF-I ligado a BSA, mezclado en proporción 1/1 (v/v) con adyuvante incompleto de Freund (Difco). Los conejos se sangraron periódicamente (10-30 ml de sangre cada 4 semanas) a partir de los 30 días después de la segunda inyección.

Las IgGs purificadas de ambos sueros (SNC y As-IGF-I) se obtuvieron utilizando columnas de DEAE-celulosa (Whatman Biosystems, Maidstone, Reino Unido), equilibradas y eluidas con tampón fosfato 0,01 M, pH 7. Se midieron las absorbancias de las fracciones eluidas a 280 y 310 nm. Se recogieron las fracciones de mayor absorbancia, se mezclaron, se repartieron en alícuotas y se calculó su concentración mediante la ecuación de conversión:

$$A_{280} - A_{310} \times \text{factor de dilución} \times 0,7 = [\text{mg/ml}]$$

## Producción del antisuero anti-VIP

VIP porcino altamente purificado (Bachem) fue conjugado a BSA utilizando carbodiimida como agente acoplante (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Este complejo que contenía 12,2 mg de VIP, fue emulsionado con adyuvante completo de Freund (Difco) en proporción 1/1 (v/v) y con 4 mg de *Micobacterium tuberculosis* (Difco) por conejo. Esta emulsión fue aplicada a conejos machos neocelandeses mediante múltiples inyecciones subcutáneas. En la primera inmunización, cada conejo recibió una dosis subcutánea de *Bordetella pertussis* (Difco). En las inyecciones de recuerdo, la suspensión de VIP se emulsionó exclusivamente con adyuvante incompleto de Freund (Difco).

Los conejos fueron sangrados periódicamente cada 4 semanas, a partir de los 15 días después de la inmunización. En cada suero obtenido de los distintos sangrados se analizó su capacidad y especificidad.

Los antisueros anti-VIP y anti-IGF-I han sido previamente caracterizados y utilizados en varios estudios (Aguado, 1992; Lorenzo, 1989) donde se ha demostrado que bloquean los efectos biológicos de VIP e IGF-I.

## VIII. DISEÑOS EXPERIMENTALES

### Estudios en las células hipofisarias de rata (cultivo primario)

Las células hipofisarias de ratas macho, se mantuvieron en cultivo en las condiciones estándar en medio DMEM con suero durante 72 horas. A continuación, se procedió a su utilización en los diferentes diseños experimentales.

- **Estudio dosis-respuesta y tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias.**

#### — *Determinación de la incorporación de BrdU*

La incorporación de BrdU a las células en cultivo se estudió mediante técnicas inmunocitoquímicas (apartado V). Para estos estudios se emplearon placas multipocillo (24 pocillos), y en cada pocillo se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células/ 0,5 ml de medio. Tras el periodo de preincubación de 72 horas, el crecimiento celular fue sincronizado manteniendo las células en medio DMEM sin suero durante 24 horas. Posteriormente, se retiraron los medios y se reemplazaron por nuevo medio definido sin suero y las células se incubaron en presencia de rhIGF-I (PreproTech EC, Londres, Reino Unido) [ $10^{-9}$  M], [ $10^{-8}$  M] y [ $10^{-7}$  M] durante 24, 48 y 72 horas. Para cada tiempo de experimentación existía un grupo de pocillos control. A todos los grupos se les añadió BrdU a una concentración final de [ $10 \mu\text{M}$ ] 24 horas antes de finalizar el experimento.

Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos como se explicó en el apartado V. Los medios se procesaron para la cuantificación de PRL-IR por RIA (apartado III).

— ***Cuantificación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)***

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron  $10^6$  células/ 1,5 ml. Las células se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, las placas se dividieron en dos grupos: controles y tratados con IGF-I [ $10^{-9}$  M], [ $10^{-8}$  M] y [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas.

A continuación, se llevó a cabo la preparación de muestras y el análisis de PCNA por Western blot como se describió en el apartado IV. La primera incubación se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (PC10) de DAKO.

• **Efecto del bloqueo de IGF-I con un antisuero específico (As-IGF-I), sobre la proliferación celular.**

— ***Determinación de la incorporación de BrdU***

Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M], de antisuero de IGF-I (As-IGF-I) [10 µg de IgGs/ ml], o de ambos durante 48 horas. A todos los grupos se les añadió BrdU [10 µM] 24 horas antes de finalizar el experimento.

Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos como se explicó en el apartado V.

— ***Cuantificación de PCNA***

Las células se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M], de antisuero de IGF-I (As-IGF-I) [10 µg de IgGs/ ml], o de ambos durante 48 horas. Como control se utilizó un grupo tratado con la misma cantidad de IgGs procedentes de SNC preinmune.

La preparación de las muestras y el análisis de PCNA por Western blot se llevó a cabo como se explicó en el apartado IV. La primera incubación se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (PC10) de Dako.

- **Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas.**

Para estos estudios se emplearon placas multipocillo (24 pocillos), y en cada pocillo se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células/ 0,5 ml de medio. Las células se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 24, 48 y 72 horas. Para cada tiempo de experimentación existía un grupo de pocillos control. A todos los grupos se les añadió BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] 24 horas antes de finalizar el experimento.

Posteriormente, se procedió a la fijación celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos como se explicó en el apartado V. Los medios se procesaron para la cuantificación de PRL-IR por RIA (apartado III).

- **Estudio de la acción proliferativa de IGF-I y VIP en las células lactotropas.**

Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, los pocillos se dividieron en grupos: controles, tratados con IGF-I [ $10^{-7}$  M], tratados con VIP porcino (Bachem) [ $10^{-7}$  M], o con IGF-I y VIP conjuntamente durante 48 horas. A todos los grupos se les añadió BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] 24 horas antes de finalizar el experimento.

Finalizado el experimento, se procedió a la fijación del cultivo celular y mediante técnicas inmunocitoquímicas (apartado V) se analizaron y cuantificaron las células lactotropas que habían proliferado como consecuencia de la acción de IGF-I y de VIP.

- **Efecto del bloqueo de VIP con un antisuero específico (As-VIP) sobre la proliferación de las células lactotropas, inducida por IGF-I.**

Las células hipofisarias se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, unos grupos se preincubaron en presencia de antisuero de VIP (As-VIP) [10 µg de IgGs/ ml] durante una hora. Posteriormente, los pocillos se dividieron en grupos: controles, tratados con IGF-I [ $10^{-7}$  M], con As-VIP y con IGF-I y As-VIP conjuntamente durante 48 horas. A todos los grupos se les añadió BrdU [10 µM] 24 horas antes de finalizar el experimento.

Concluido el experimento las células se fijaron para el estudio inmunocitoquímico (apartado V) y los medios se procesaron para la cuantificación de PRL-IR mediante técnicas de RIA (apartado III).

- **Estudios de las vías de señalización implicadas en la proliferación de las células lactotropas, inducida por IGF-I y VIP.**

- ***Efecto del bloqueo de la vía MAPK con un inhibidor selectivo (PD098059)***

Para el estudio de esta vía se empleó el inhibidor PD098059 (Alexis Corp., San Diego, CA, USA) que bloquea selectivamente la actividad de MAPKK (MEK). Tras el periodo de preincubación, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, se retiraron los medios y se reemplazaron por nuevo medio definido sin suero, y las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de este inhibidor a dosis final de [1 µM] y [10 µM]. A continuación, se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. A todos los grupos se les añadió BrdU a una concentración final de [10 µM] 24 horas antes de finalizar el experimento. Finalmente, las células se procesaron para la cuantificación de la proliferación celular mediante inmunocitoquímica (apartado V).

— **Efecto del bloqueo de la proteína quinasa A (PKA) con un antagonista competitivo del AMPc (Rp-cAMPS)**

Para bloquear la actividad PKA se utilizó un antagonista competitivo del AMPc, el Rp-isómero; sal de trietil-amonio (adenosina-3'-5'-monofosforotioato), suministrado por Alexis Corp. Siguiendo el diseño experimental descrito anteriormente, las células se preincubaron en medio definido sin suero durante 45 minutos en presencia de Rp-cAMPS a dosis final de [1  $\mu$ M] y [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se incubaron en presencia de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. A todos los grupos se les añadió BrdU [10  $\mu$ M] 24 horas antes de finalizar el experimento. Finalmente, las células se procesaron para la cuantificación de la proliferación celular mediante inmunocitoquímica (apartado V).

— **Efecto del bloqueo de la vía PI3'-Kinasa con un inhibidor específico (LY294002)**

Siguiendo el diseño del experimento anterior, para el estudio de esta vía se empleó el inhibidor LY294002 (Alexis Corp.) que bloquea específicamente la PI3'-Kinasa. Las células se preincubaron en medio definido sin suero durante 45 minutos en presencia de este inhibidor a dosis final de [10  $\mu$ M] y [20  $\mu$ M]. Posteriormente, se incubaron en presencia o no de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. A todos los grupos se les añadió BrdU [10  $\mu$ M] 24 horas antes de finalizar el experimento. A continuación, las células se procesaron para la cuantificación de la proliferación celular mediante inmunocitoquímica (apartado V).

• **Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I y VIP sobre la activación de la MAPK (ERK 1/ 2).**

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron 10<sup>6</sup> células/ 1,5 ml. Las células se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron en presencia

o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30 y 60 minutos. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado IV. La primera incubación se realizó con un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2) (Sigma). Como control de carga se empleó un anticuerpo anti-MAPK (ERK 1/2) que reconoce específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta proteína quinasa (Sigma).

Para tener una comprobación morfológica de la activación de la vía MAPK, como consecuencia de la acción de IGF-I y VIP, se llevaron a cabo, en paralelo estudios citoquímicos de dichos cultivos. Para ello se emplearon placas multipocillo (24 pocillos) donde se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células/ 0,5 ml. Las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos como se describió en el apartado V.

- **Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I y VIP sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa.**

Siguiendo el diseño del experimento anterior, las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30, 60, 120 y 180 minutos, y con VIP [ $10^{-7}$  M] durante 10, 30, 60 y 120 minutos. A continuación se cuantificó la activación de la PI3'-kinasa por Western blot mediante el empleo del anticuerpo específico que reconoce las formas fosforiladas de Akt (Ser<sup>473</sup>) suministrado por New England Biolabs. Como control de carga se empleó un anticuerpo anti-Akt que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta proteína quinasa (New England Biolabs).

- **Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PI3'-Kinasa y PKA sobre la activación de la vía MAPK inducida por IGF-I y VIP.**

Las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en



presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M], LY294002 [20  $\mu$ M] y Rp-cAMPS [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 2 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot según el protocolo anteriormente descrito.

- **Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I y VIP sobre la activación de CREB.**

Las células hipofisarias se preincubaron y sincronizaron como se ha descrito anteriormente. A continuación se incubaron en presencia de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60 y 180 minutos; en el caso de VIP el tratamiento se prolongó hasta las 24 horas. La preparación de las muestras y el análisis de proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado IV. La primera incubación se realizó con un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>) (Upstate Biotechnology). Como control de carga se empleó un anticuerpo anti-CREB que reconoce específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta proteína quinasa (Santa Cruz Biotechnologies).

Para el estudio del tipo celular en el cual se fosforila CREB (Ser<sup>133</sup>) como consecuencia de la acción de IGF-I y VIP, se llevaron a cabo, en paralelo estudios citoquímicos de dichos cultivos. Para ello las células hipofisarias, en placas multipocillo, se incubaron en presencia de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 10 minutos. Para los estudios inmunocitoquímicos las muestras se analizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.

- **Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación del factor transcripcional CREB inducido por IGF-I y VIP.**

Las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M], y Rp-cAMPS [10  $\mu$ M].

Posteriormente, se añadió IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>) por Western blot según el protocolo anteriormente descrito.

- **Estudio de la acción antiapoptótica de IGF-I en las células hipofisarias.**

Las células hipofisarias se preincubaron como se ha descrito anteriormente en placas de cultivo de 35 mm de diámetro en medio definido con 3% FCS. A continuación, se incubaron en medio definido sin suero en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas. Los extractos celulares se analizaron por Western blot empleando un anticuerpo policlonal específico de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (N-19) suministrado por Santa Cruz Biotechnologies Inc.

- **Efecto del bloqueo de la vía PI3'-Kinasa sobre la acción antiapoptótica de IGF-I en las células hipofisarias.**

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se preincubaron en medio definido sin suero durante 45 minutos en presencia de LY294002 a una dosis final de [20  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente las células se procesaron para el análisis de Bcl-2 por Western blot como se ha descrito anteriormente.

- **Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la activación de Bad en las células hipofisarias.**

Tras la preincubación, las células se incubaron en medio definido sin suero y se trataron con de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30 y 60 minutos. A continuación se cuantificó la activación de Bad por Western blot mediante el empleo del anticuerpo específico que reconoce las formas fosforiladas de Bad (Ser<sup>136</sup>) suministrado por Cell Signaling Technology™. Como control de carga se empleó un anticuerpo anti-Bad que reconoce

específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta proteína quinasa.

## **Estudios en la línea celular GH4C1**

La línea celular hipofisaria GH4C1 se mantuvo en cultivo en medio DMEM con suero durante 24 horas para estudios de transfección celular (apartado VI). Se lavaron los cultivos con solución PBS y seguidamente se procedió a su utilización en los diferentes protocolos experimentales.

- **Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión basal del gen de luciferasa pGL3-Control.**

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron  $8 \times 10^5$  células/ 1,5 ml en medio con 10% FCS. Tras el periodo de preincubación de 24 horas, las células se transfectaron, en medio sin suero, con el vector pGL3-Control y se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante 24 horas. Posteriormente, las células se procesaron para la realización de los ensayos de actividad luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa como se describió en el apartado VI.

- **Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE.**

Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, las células se transfectaron, en medio sin suero, con el vector pGL3-SRE o pGL3-CRE y se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] o VIP [ $10^{-7}$  M] durante 24 horas. Las células se procesaron para la realización de los ensayos de actividad luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa como se ha descrito anteriormente.

- **Efecto del bloqueo de la vía MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el elemento de respuesta CRE e inducido por IGF-I y VIP.**

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se transfectaron, en medio sin suero, con el vector pGL3-CRE. Posteriormente, las células fueron preincubadas con PD098059 a una dosis final de [50  $\mu$ M], y Rp-cAMPS a una dosis de [10  $\mu$ M] durante 45 minutos. A continuación, se incubaron en presencia o no de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M] durante un periodo de 24 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las células se procesaron para la realización de los ensayos de actividad luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa como se ha descrito anteriormente.

## IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos, el número de placas de cultivo por cada grupo fue de 4 ó 5. Cada experimento fue repetido al menos en dos ocasiones, aunque en la mayoría de los casos los resultados se confirmaron en tres o más. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar, (  $m \pm E.S.$  ).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para muestras dependientes o independientes, en su caso. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test t de Fischer para datos no pareados y mediante el test de Student para datos pareados. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando sus medias mostraron una probabilidad de error  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## **1. ACCIÓN DE IGF-I SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS HIPOFISARIAS**

La proliferación de las células hipofisarias está regulada por la interacción de señales procedentes de factores hipotalámicos, periféricos y locales. Existe un gran número de factores que son producidos y secretados en la hipófisis, donde regulan localmente a las células secretoras hipofisarias (Schwartz, 2000).

El IGF-I es un factor mitogénico (Conover, 1985) e inductor de diferenciación que se sintetiza en la hipófisis (Bach, 1992). En células tumorales hipofisarias, IGF-I promueve la proliferación de adenomas hipofisarios humanos (Renner, 1993; 1996) y de una línea celular productora de PRL, células GH3 (Hayashi, 1984).

Los estudios que se describen a continuación se realizaron con el fin de clarificar el papel de IGF-I como factor mitogénico hipofisario.

### **1.1. Acción proliferativa dosis-tiempo-respuesta de IGF-I: determinación de la incorporación de BrdU**

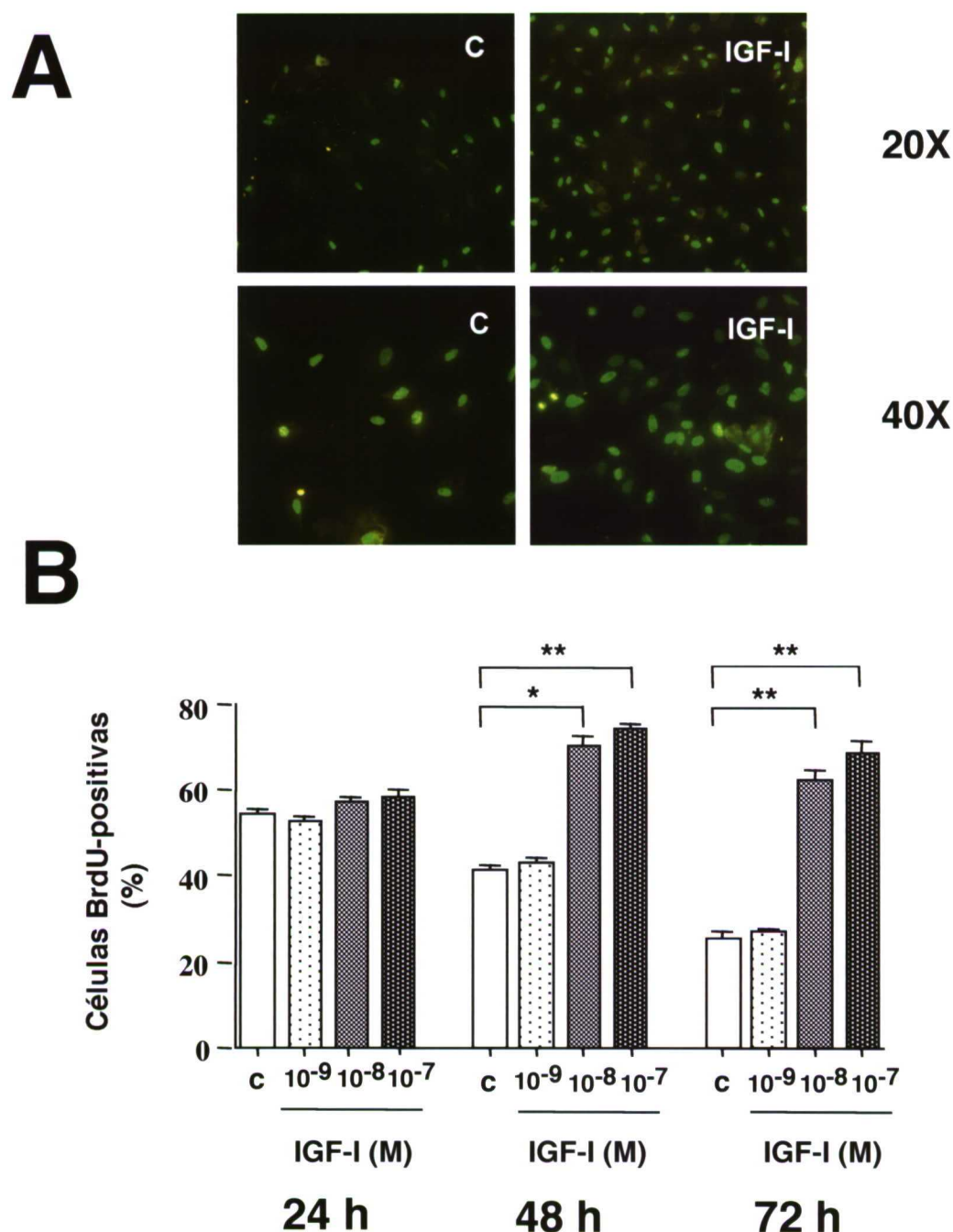
Para valorar la posible acción de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias se empleó como marcador la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), el cual es un análogo de la uridina que se incorpora en el ADN durante la fase S del ciclo celular y puede ser detectado mediante un anticuerpo específico por técnicas citoquímicas (Gratzner, 1982).

Para la realización de este estudio, células hipofisarias de rata se preincubaron en placas multipocillos y se sincronizaron 24 horas en medio sin suero. Posteriormente, se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-9}$  M], [ $10^{-8}$  M] y [ $10^{-7}$  M] durante diversos tiempos: 24, 48 y 72 horas. BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se detectó la incorporación de BrdU, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU mediante técnicas de inmunofluorescencia. La detección

de BrdU se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína, el cual marca los núcleos en verde.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 1, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células tratadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas, se observa un claro aumento en el número de células BrdU-positivas respecto a los controles no tratados. En el panel B se representa el análisis cuantitativo del porcentaje de las células BrdU-positivas respecto al número total de células. Se observa que determinadas dosis de IGF-I incrementan marcadamente el número de células BrdU-positivas. En los grupos control y en los tratados con las dosis más bajas de IGF-I, el número de células BrdU-positivas fue disminuyendo moderadamente con el tiempo de cultivo. Esto podría ser debido a que el medio de cultivo carece de suero lo que contribuye a una disminución en la proliferación celular.

Estos datos **confirman la acción proliferativa de IGF-I en células hipofisarias normales**, a dosis de [ $10^{-8}$  M] y [ $10^{-7}$  M], que se puso en evidencia después de 48 horas de incubación con IGF-I y que se mantuvo a las 72 horas de exposición.



**Figura 1. Estudio dosis-tiempo-respuesta de la acción de IGF-I sobre el número de células BrdU-positivas en células hipofisarias de rata.** El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, las células se incubaron con diferentes dosis de IGF-I durante tiempos variables. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU a una concentración final de  $[10\mu\text{M}]$  24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación se procedió al análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia.

**A:** El panel muestra la incorporación de BrdU en células hipofisarias en presencia o no de IGF-I  $[10^{-7}\text{M}]$  durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (núcleo marcado en color verde).

**B:** La figura representa el porcentaje de las células BrdU-positivas respecto al número total de células. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*,  $p<0,05$ , \*\*,  $p<0,01$ .



## 1.2. Acción proliferativa dosis-respuesta de IGF-I: cuantificación de PCNA

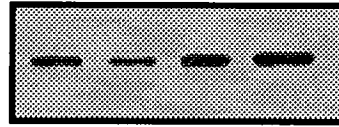
Para confirmar la acción proliferativa de IGF-I se cuantificó el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por Western blot.

La proteína PCNA es una molécula de 36 KDa altamente conservada en las especies a lo largo de la evolución, y que actúa como un cofactor de la ADN-polimerasa  $\delta$  durante la fase S del ciclo celular. Por tanto, su expresión es inducida cuando la célula entra en división (Hall, 1990), lo que permite su utilización como marcador para detectar proliferación celular.

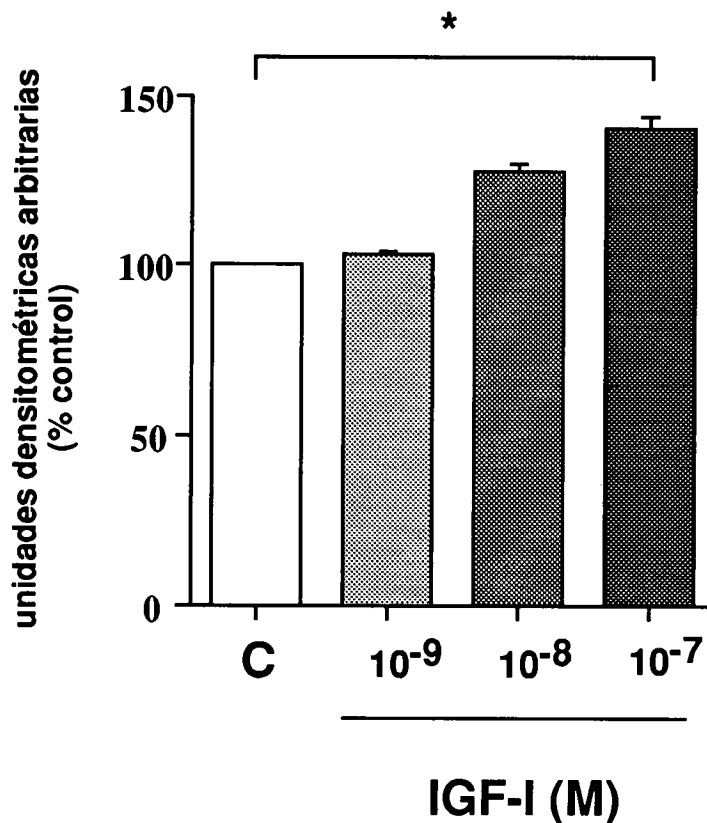
Con el fin de determinar la acción proliferativa de IGF-I cuantificando la proteína PCNA, las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-9}$  M], [ $10^{-8}$  M] y [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas. Los extractos de proteínas y su análisis por Western blot se llevó a cabo como se describió en material y métodos (apartado IV), utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PCNA.

En la Figura 2A se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot de la proteína PCNA de células hipofisarias incubadas en presencia o no de IGF-I durante 48 horas. En la Figura 2B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa un aumento de los niveles de la proteína PCNA en las células tratadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M] a las 48 horas del tratamiento.

Estos resultados **confirman la acción proliferativa de IGF-I sobre células hipofisarias de rata en cultivo primario**, valorado por otro marcador de proliferación celular.

**A**IGF-I (M) -  $10^{-9}$   $10^{-8}$   $10^{-7}$ 

◀ **PCNA**  
36 KDa

**B**

**Figura 2. Efecto de IGF-I sobre los niveles de la proteína PCNA en cultivos de células hipofisarias de rata.** Las células una vez sincronizadas fueron incubadas con IGF-I [ $10^{-9}$ M], [ $10^{-8}$ M] y [ $10^{-7}$ M] durante 48 horas. La actividad proliferativa fue analizada midiendo la proteína PCNA por Western blot.

**A:** Autorradiografía representativa de un experimento, correspondiente a un Western blot de la proteína PCNA.

**B:** La figura muestra la cuantificación densitométrica, en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*,  $p < 0,05$ .

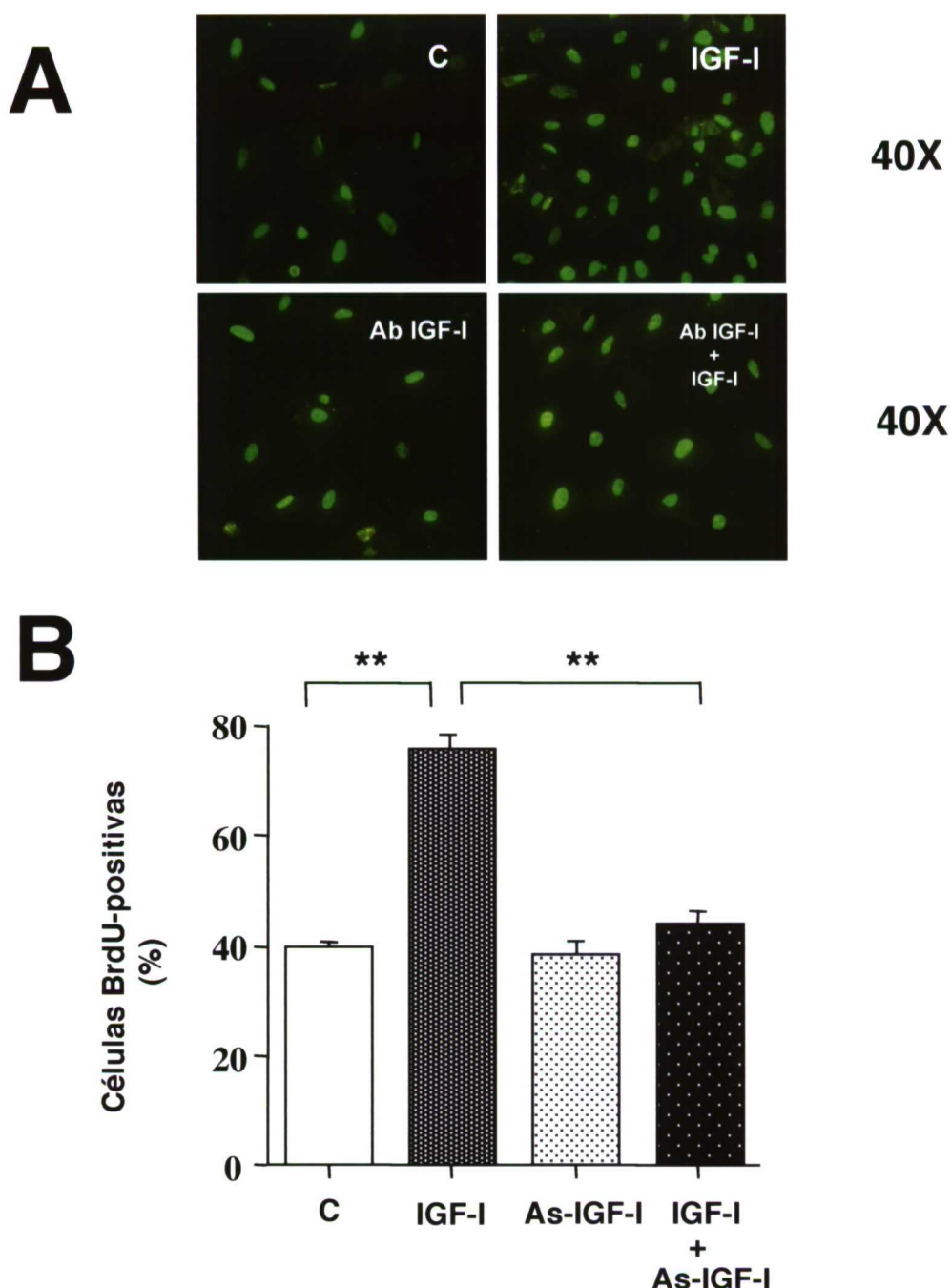
### **1.3. Efecto del bloqueo de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias: determinación de PCNA y de la incorporación de BrdU**

Para determinar la especificidad de la acción de IGF-I en la proliferación de células hipofisarias se realizaron experimentos bloqueando el IGF-I con antisuero de IGF-I (As-IGF-I).

Para el análisis de la proliferación se determinó la incorporación de BrdU por técnicas inmunocitoquímicas y la cuantificación de PCNA por Western blot siguiendo el diseño experimental descrito anteriormente. En la realización de este estudio, las células hipofisarias de rata se incubaron en presencia de As-IGF-I [10 µg de IgGs/ml] una hora antes de la adición de IGF-I [ $10^{-7}$  M]. BrdU [10 µM] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 3, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células tratadas con IGF-I se confirma la acción proliferativa ya que se observa un mayor número de células BrdU-positivas respecto a los controles no tratados. Además, en las células incubadas con IGF-I en presencia de As-IGF-I, hay una clara disminución del número de células BrdU-positivas con respecto a las tratadas con IGF-I. En el panel B se representa el porcentaje de las células BrdU-positivas respecto al número total de células. La adición de As-IGF-I bloquea completamente el estímulo de IGF-I sobre el número de células que incorporan BrdU. El As-IGF-I sólo no altera el número de células BrdU-positivas. La Figura 4A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot de la proteína PCNA, de células incubadas en presencia de IGF-I, con o sin As-IGF-I, durante 48 horas. En la Figura 4B se muestra la cuantificación densitométrica de PCNA, en porcentaje respecto al grupo control. El suero normal de conejo (SNC) no altera los niveles basales de esta proteína. Se confirma que la presencia de As-IGF-I bloquea el estímulo de IGF-I sobre los niveles de la proteína PCNA.

Estos resultados indican que el As-IGF-I abole la acción proliferativa de IGF-I, confirmando que el **IGF-I hipofisario ejerce una acción mitogénica específica sobre las células hipofisarias.**



**Figura 3. Efecto del bloqueo de IGF-I sobre la proliferación de las células hipofisarias.** El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$ M], As-IGF-I [ $10 \mu\text{g}$  de IgGs/ml] o IGF-I + As-IGF-I durante 48 horas. Los controles se incubaron en el medio de cultivo. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación se procedió al análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia.

**A:** El panel muestra la incorporación de BrdU en células hipofisarias en presencia o no de IGF-I y del As-IGF-I. Se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (núcleo marcado en color verde).

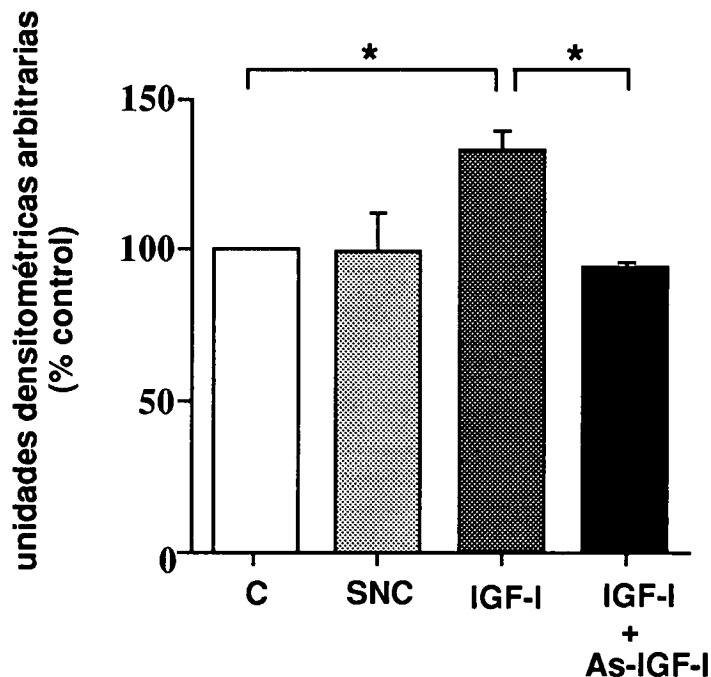
**B:** La figura representa el porcentaje de células BrdU-positivas respecto al número total de células. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*\*,  $p<0,01$ .

**A**

SNC	-	+	-	-
IGF-I	-	-	+	+
As-IGF-I	-	-	-	+



◀ **PCNA**  
36 KDa

**B**

**Figura 4. Efecto del bloqueo de IGF-I sobre los niveles de la proteína PCNA en cultivos de células hipofisarias de rata.** Las células una vez sincronizadas fueron incubadas con IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 48 horas. Otros grupos se incubaron con IGF-I + As-IGF-I [ $10 \mu\text{g}$  de IgGs/ml]. Como control se utilizó además un grupo tratado con la misma cantidad de IgGs procedentes del suero normal de conejo (SNC). La actividad proliferativa fue analizada midiendo la proteína PCNA por Western blot.

**A:** Autorradiografía correspondiente a un Western blot de la proteína PCNA.

**B:** La figura muestra la cuantificación densitométrica, en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*, $p<0,05$ .

## **2. ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS**

La proliferación de las células lactotropas en la hipófisis está regulada por interacciones de señales hipotalámicas, periféricas y locales (Arita, 1998; Hashi, 1996; Oomizu, 1998). Nos propusimos estudiar la acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de este específico tipo celular, las células lactotropas, así como analizar si existía alguna interacción entre ambos factores.

### **2.1. Efecto de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas: estudio tiempo-respuesta**

En el apartado anterior se ha demostrado la acción proliferativa de IGF-I sobre las células hipofisarias en cultivo primario mixto. Era importante determinar sobre qué tipo o tipos celulares ejercía su acción proliferativa.

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que IGF-I, en cultivos de células hipofisarias de rata, aumentaba los niveles de PRL en el medio a las 48 horas, sin modificar su expresión génica (Lara, 1994). Por lo tanto, ésta liberación inducida por IGF-I podría ser secundaria a un aumento en el número de las células lactotropas. Otros estudios han sugerido el posible papel de IGF-I como factor proliferativo en las células lactotropas mediando acciones de estrógenos (Michels, 1993). Datos recientes demuestran que ratones con disrupción del gen de IGF-I, presentan disminución en el número de células lactotropas (Stefaneanu, 1999). Estas observaciones apoyan la posibilidad de que IGF-I posea actividad mitogénica sobre las células lactotropas.

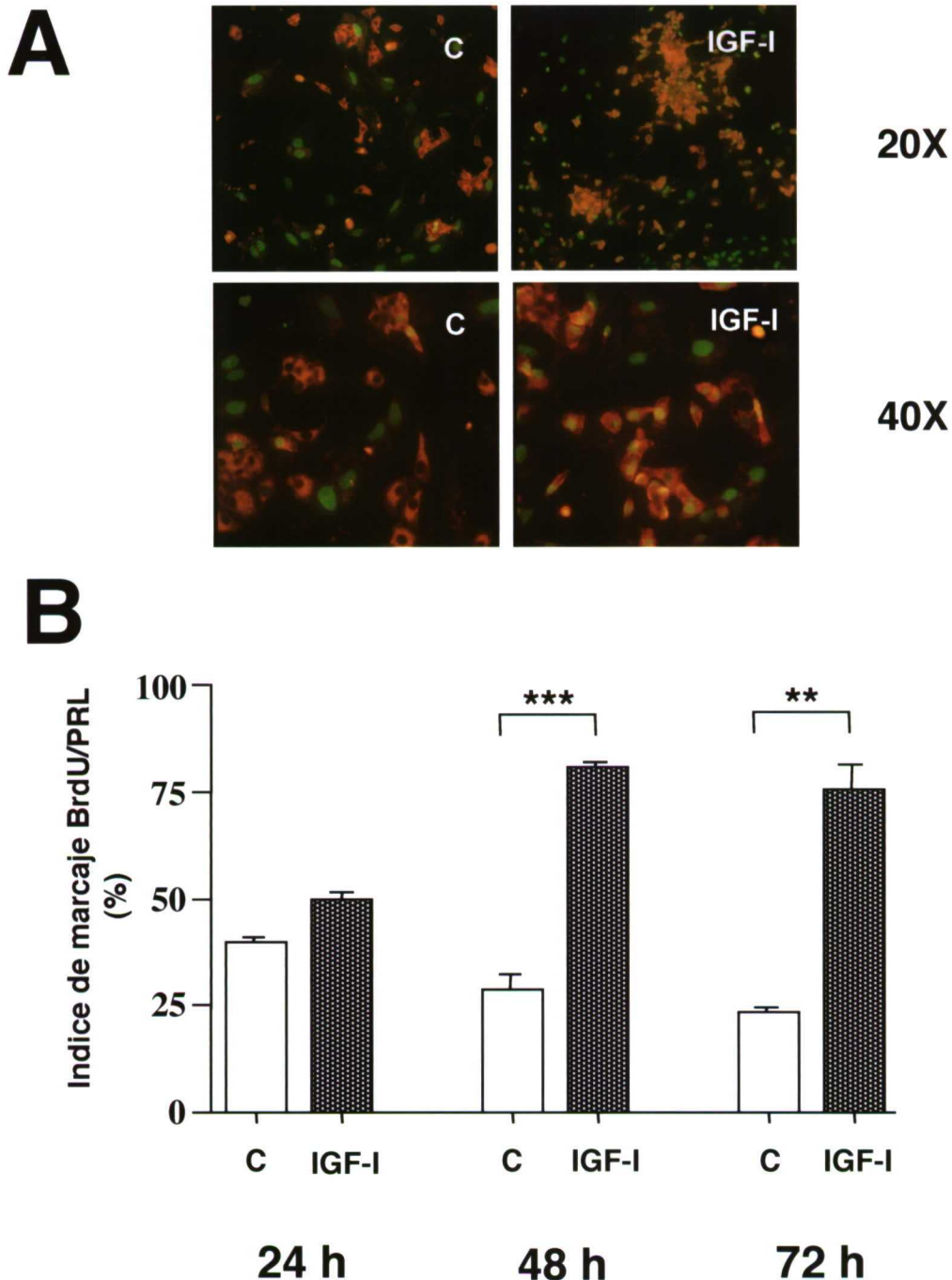
Para este análisis se utilizaron técnicas de doble inmunofluorescencia, con un marcador específico para medir proliferación celular (anticuerpo anti-BrdU), y un anticuerpo específico anti-PRL para identificar a las células lactotropas. Para la realización de estos estudios, las células hipofisarias se preincubaron y sincronizaron en placas multipocillo como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$

M] durante 24, 48 y 72 horas. BrdU [ $10\ \mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL. La detección de BrdU se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína marcando los núcleos en verde, y para las células lactotropas un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, apareciendo los citoplasmas en rojo.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 5, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células tratadas con IGF-I [ $10^{-7}\ \text{M}$ ] durante 48 horas, se observa un claro aumento en el número de células BrdU y PRL-positivas con respecto a los controles no tratados. En algunas células la aparición del color amarillo en los núcleos resulta de la mezcla de color rojo y verde debido a la expresión en la misma célula del marcador de proliferación BrdU y PRL. En el panel B se representa el porcentaje de las células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas, respecto al grupo control correspondiente. La presencia de IGF-I induce un claro aumento en el número de las células BrdU y PRL-positivas, que se puso en evidencia después de 48 horas de incubación con IGF-I y que se mantuvo a las 72 horas de exposición. En los controles se observa una disminución progresiva relacionada con el tiempo de cultivo, que podría explicarse por la falta de suero en los medios, con lo que se produce una disminución en la proliferación celular.

Estos datos demuestran que **IGF-I aumenta específicamente y significativamente la proliferación de las células lactotropas.**





**Figura 5. Estudio tiempo-respuesta de la acción de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas.** El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante tiempos variables. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [ $10 \mu$ M] 24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** El panel muestra una doble inmunofluorescencia de células hipofisarias en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-BrdU para la detección de la proliferación celular (núcleo marcado en color verde) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en color rojo).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 2.2. Efecto de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas

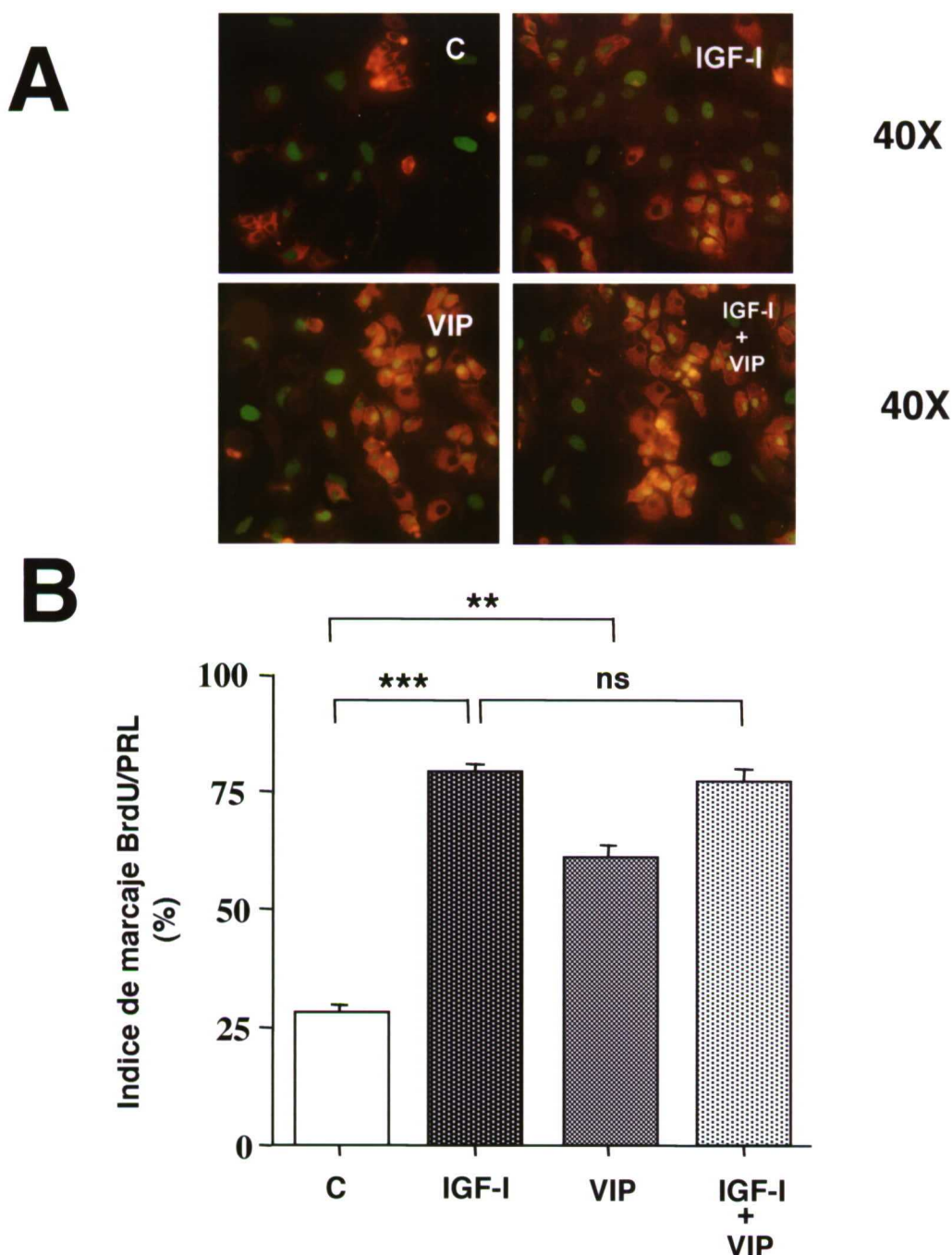
VIP es un neuropéptido con gran ubicuidad que entre sus múltiples acciones biológicas participa en la liberación de PRL (López, 1989). VIP es también expresado en la adenohipófisis (Arnaout, 1986) donde es regulado por señales hipotalámicas, periféricas y locales (Lam, 1990; Balsa, 1994; Lara, 1994). Hay trabajos que han sugerido que los estrógenos inducen la proliferación de las células lactotropas a través del aumento de la concentración de VIP en la hipófisis (Pryor-Jones, 1988). Además, se ha demostrado una acción de VIP sobre el crecimiento de células tumorales humanas de origen hipofisario (Pryor-Jones, 1989).

Todo ello, nos llevó a estudiar el posible papel de VIP en la proliferación de las células lactotropas; así como el efecto de IGF-I y VIP simultáneamente. Siguiendo el diseño experimental utilizado en los experimentos previos, las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M], VIP [ $10^{-7}$  M], o de ambos simultáneamente durante un periodo de 48 horas. BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL. La detección de BrdU se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína marcando los núcleos en verde, y para las células lactotropas un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, apareciendo los citoplasmas en rojo.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 6, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células tratadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M], VIP [ $10^{-7}$  M] o ambos durante 48 horas, se observa un aumento evidente en el número de las células BrdU y PRL-positivas con respecto a los controles no tratados. Además, se observa mayor densidad de células lactotropas en los grupos tratados con estos factores de crecimiento. En el panel B se representa el porcentaje de las células hipofisarias inmunoreactivas

para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Se observa que IGF-I y VIP inducen la proliferación de las células lactotropas, si bien el efecto es más evidente en presencia de IGF-I. La presencia simultánea de ambos no conduce a un incremento en el número de células BrdU y PRL-positivas superior al observado cuando se añade sólo IGF-I, lo que confirma la falta de sinergismo entre IGF-I y VIP.

Estos datos demuestran que **VIP aumenta significativamente la proliferación de células lactotropas. La presencia simultánea de ambos factores, no tuvo un efecto sinérgico lo que sugiere que IGF-I y VIP utilizan mecanismos de señalización por vías dependientes.**



**Figura 6. Efecto de VIP e IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas.** Una vez sincronizado el crecimiento celular, las células fueron incubadas en presencia de VIP [ $10^{-7}$ M], IGF-I [ $10^{-7}$ M] o de ambos durante un periodo de 48 horas. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [ $10 \mu$ M] 24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** El panel muestra una doble inmunofluorescencia de células hipofisarias en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$ M], VIP [ $10^{-7}$ M] o de ambos durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-BrdU para la detección de la proliferación celular (núcleo marcado en color verde) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en color rojo).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ , ns, no significativo.

### 2.3. Efecto del bloqueo de VIP endógeno sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I

Tanto IGF-I como VIP son dos potentes factores mitogénicos que se expresan en la adenohipófisis. Varios trabajos han sugerido que los niveles de IGF-I y VIP están regulados por los estrógenos (Michels, 1993; Pryor-Jones, 1988; Lam, 1990). Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que IGF-I estimula la expresión del ARNm de VIP en la hipófisis, así como su liberación al medio (Lara, 1994); además la liberación de PRL inducida por IGF-I, está mediada por VIP.

Estas observaciones sugieren la posibilidad de que IGF-I y VIP interaccionen en su acción proliferativa. Para ello nos planteamos analizar el papel de VIP como mediador de la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I, a través del bloqueo de VIP endógeno con un antisuero específico.

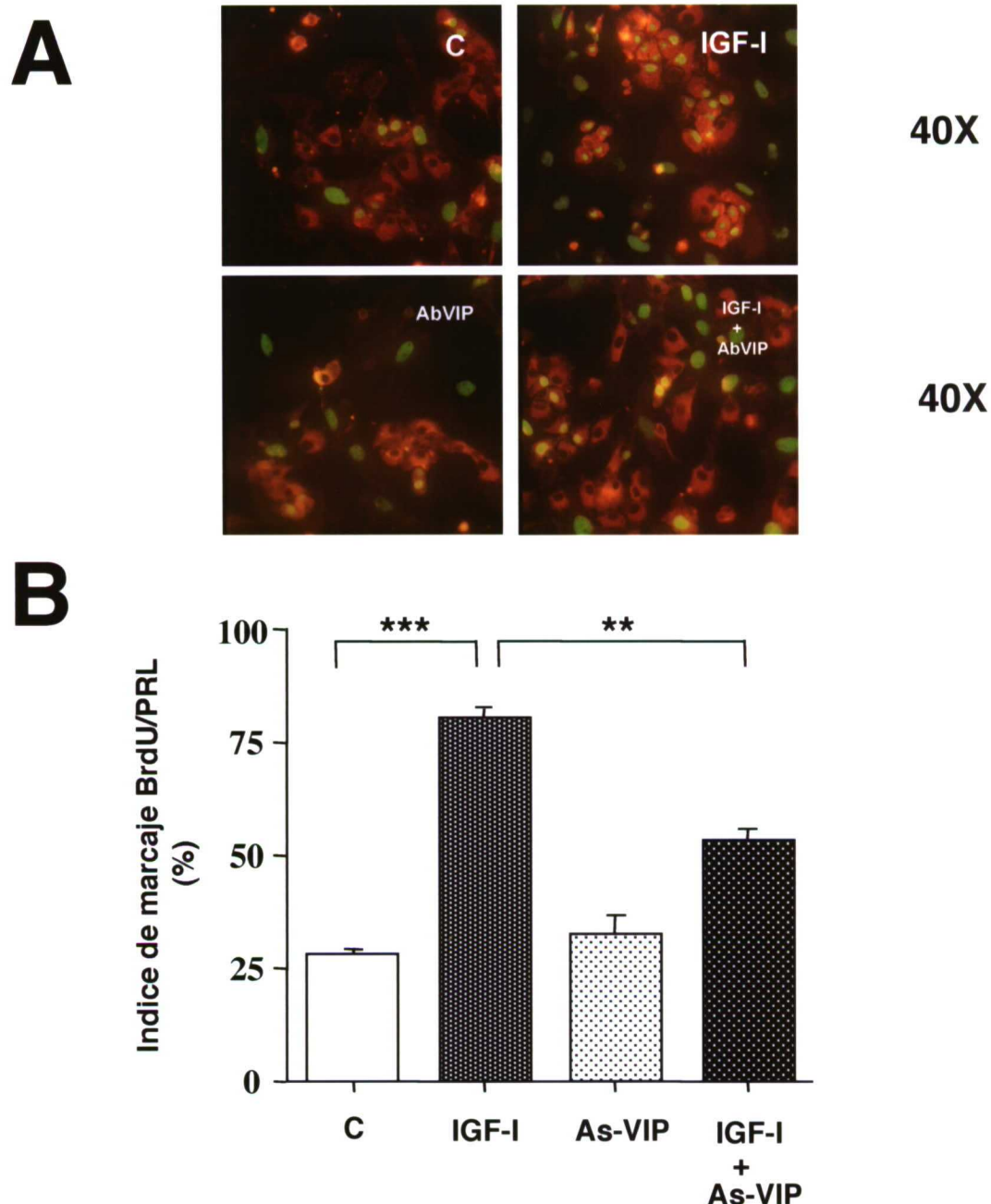
Siguiendo el diseño expuesto anteriormente, previa sincronización del ciclo celular, las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M], antisuero de VIP (As-VIP) [ $10 \mu\text{g IgGs/ml}$ ], o de ambos durante un periodo de 48 horas. El As-VIP se añadió a las células una hora antes de la adición de IGF-I. BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL. Como en experimentos previos habíamos demostrado que el suero normal de conejo (SNC) no alteraba la proliferación basal de las células lactotropas, se omitió en estos estudios.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 7, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas se confirma un claro aumento en el número de células BrdU y PRL-positivas respecto al grupo control. Además, en los cultivos tratados con IGF-I y antisuero de VIP (As-VIP), hay un evidente menor número

de células BrdU y PRL-positivas con respecto a las tratadas con IGF-I. En el panel B se representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Estos datos confirman la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas. Además, se observa que la acción proliferativa de IGF-I disminuye parcialmente por la presencia del As-VIP.

Estos resultados demuestran, por lo tanto, que **la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas depende en parte de la presencia de VIP local hipofisario.**





**Figura 7. Efecto del bloqueo del VIP endógeno sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.** El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron incubadas en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$ M], As-VIP [ $10 \mu\text{g}$  de IgGs/ml] o de ambos durante un periodo de 48 horas. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] 24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** El panel muestra una doble inmunofluorescencia de células hipofisarias en presencia de IGF-I, As-VIP o de ambos durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-BrdU para la detección de la proliferación celular (núcleo marcado en color verde) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en color rojo).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*\*,  $p<0,01$ , \*\*\*,  $p<0,001$ .

### 3. ACCIÓN DE IGF-I SOBRE LA LIBERACIÓN DE PRL

La secreción de PRL está controlada por señales inhibitoras y estimuladoras de origen hipotalámico que interactúan entre sí, pero que también dependen en su acción de la regulación ejercida por señales periféricas.

En algunos estudios se ha puesto en evidencia que la regulación de la secreción de PRL es muy dependiente de un sistema de regulación autocrina/paracrina, en el que pueden estar implicadas varias señales locales (Balsa, 1994; Wynick, 1993).

Se ha demostrado que VIP es un factor liberador de PRL (López, 1989) que se expresa en la adenohipófisis donde es regulado por hormonas tiroideas, estrógenos, TRH y dopamina (Lam, 1989; Balsa, 1994). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que VIP hipofisario puede mediar el efecto de otras hormonas o neurotransmisores implicados en la liberación de PRL (Balsa, 1996a; 1996b; 1998). Por lo tanto, la acción autocrina y paracrina de VIP cumple un papel esencial en la regulación de la secreción de PRL.

En estudios previos, también habíamos demostrado que IGF-I aumenta los niveles de PRL en el medio a las 48 horas y que éste efecto estaba específicamente mediado por VIP (Lara, 1994). Todo ello, nos llevó a analizar el papel de IGF-I sobre la liberación de PRL en las células hipofisarias.

La Figura 8 representa el efecto de IGF-I sobre la liberación de PRL en porcentaje respecto al grupo control correspondiente. Estos resultados indican que IGF-I induce un aumento significativo en el contenido intracelular y la liberación de PRL a las 48 horas de exposición, pero no a tiempos cortos de 3 horas.

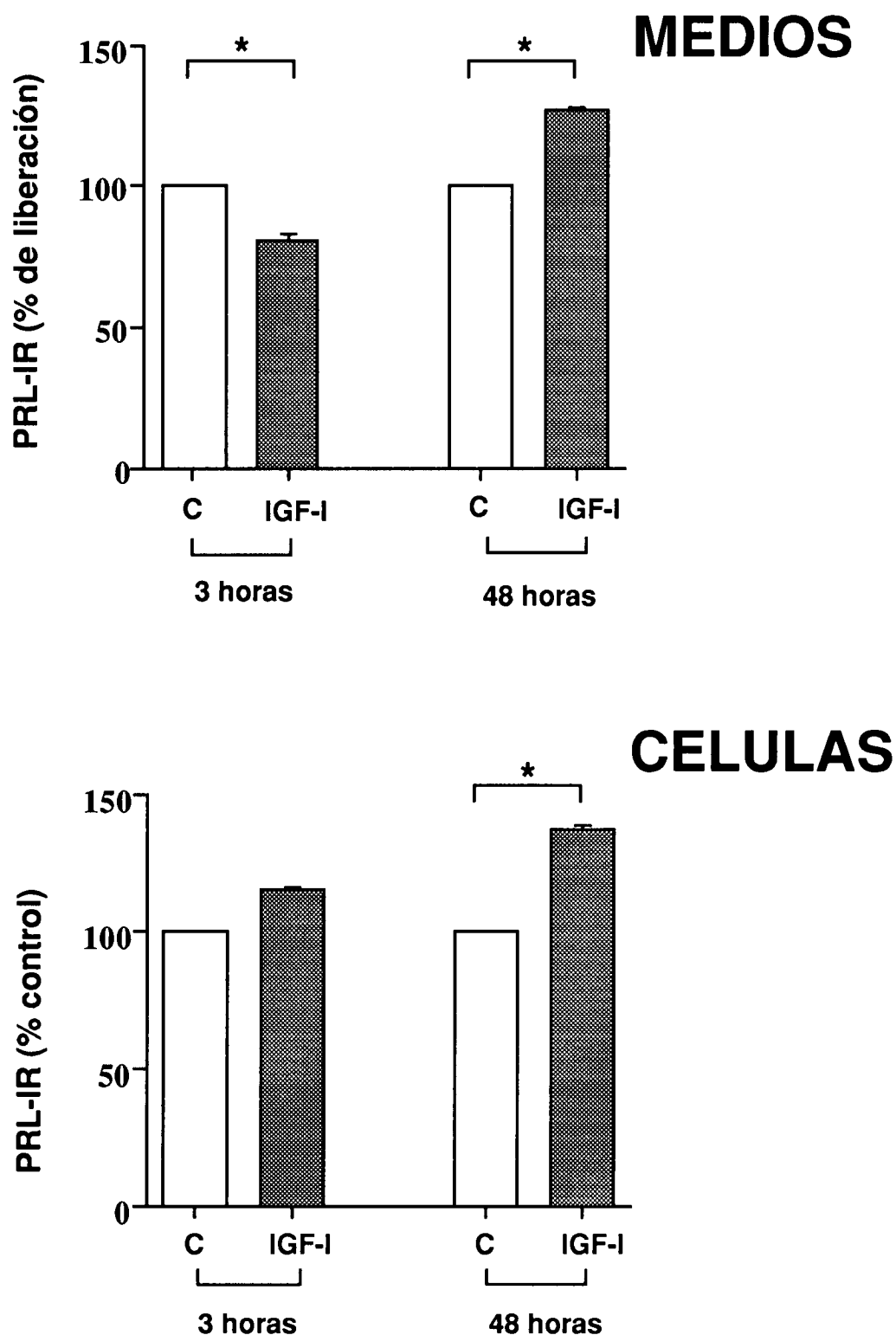
Estos resultados, junto al hecho de que IGF-I no modifica la expresión génica de PRL (Lara, 1994) nos indujo a pensar que este aumento en los niveles de PRL en el medio observado a las 48 horas de incubación con IGF-I, podría ser secundario al aumento en el número de las células lactotropas que



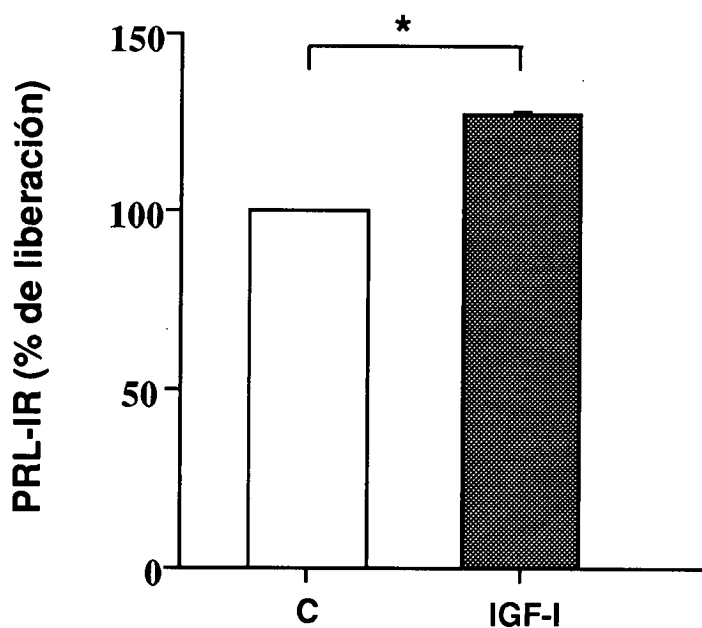
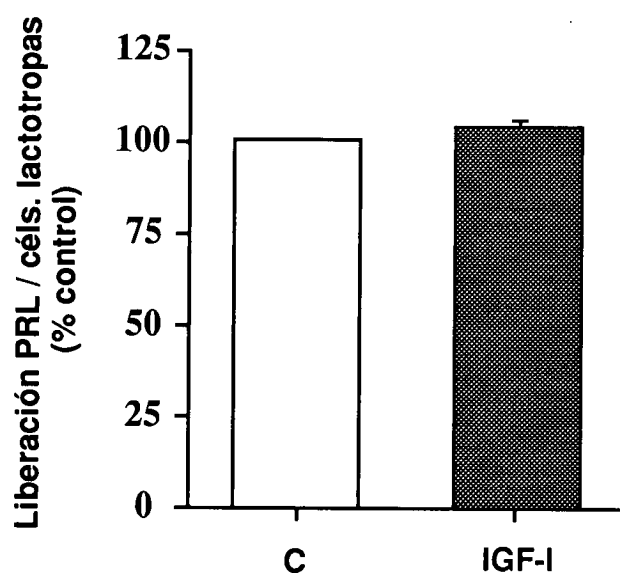
produce, como hemos demostrado en apartados anteriores. Por ello, analizamos el efecto de IGF-I sobre la liberación de PRL a las 48 horas, respecto al número de células lactotropas presentes. Los resultados se observan en la Figura 9, donde el panel A muestra el efecto de IGF-I sobre la liberación de PRL en porcentaje respecto al grupo control, y el panel B representa la liberación de PRL respecto al número de las células lactotropas. Como habíamos observado en experimentos anteriores, IGF-I induce un pequeño pero significativo incremento en la liberación de PRL (panel A). Esta acción estimuladora no se observa si se representa la liberación de PRL respecto al número de células lactotropas (panel B).

Estos datos confirman que **el aumento de PRL que se observa en los medios, después de 48 horas de incubación con IGF-I, es debida al incremento en el número de las células lactotropas inducido por IGF-I, más que al estímulo de la liberación de PRL.**





**Figura 8. Acción de IGF-I sobre el contenido intracelular y la liberación de PRL.** Las células se incubaron en medio sin suero en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante un periodo de 3 y 48 horas. La figura muestra la liberación de PRL-IR (PRL inmunoreactiva) y el contenido intracelular del péptido en presencia de IGF-I y en porcentaje respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*,  $p<0,05$ .

**A****B**

**Figura 9. Acción de IGF-I sobre la liberación de PRL en cultivos de células hipofisarias.** Las células fueron incubadas en medio sin suero durante 48 horas con IGF-I [ $10^{-7}$  M].

**A:** La figura muestra el efecto de IGF-I sobre la liberación de PRL, en porcentaje con respecto al grupo control.

**B:** La figura representa la liberación de PRL respecto al número de células lactotropas en presencia de IGF-I y en porcentaje respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*,  $p<0,05$ .

## **4. MECANISMO DE ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN**

Como ya se ha descrito anteriormente IGF-I y VIP inducen la proliferación de las células lactotropas hipofisarias. Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de clarificar el mecanismo por el cual IGF-I y VIP promueven la proliferación de las células lactotropas. El estudio se realizó empleando técnicas inmunocitoquímicas para la identificación de las células lactotropas.

### **4.1. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PKA y PI3'-Kinasa con inhibidores específicos sobre la proliferación de células lactotropas inducida por IGF-I**

Las acciones de IGF-I están mediadas por un receptor del tipo tirosina quinasa que se expresa en las células hipofisarias (Goodyer, 1984).

Estudios previos han demostrado que la vía Ras/MAPK media la proliferación de las células lactotropas inducida por la insulina, sugiriendo que este efecto se produce en parte a través del receptor de IGF-I (Suzuki, 1999). También se ha evidenciado el importante papel que tiene el AMPc en la proliferación de las células lactotropas. Por otra lado, en los resultados descritos previamente hemos demostrado que VIP induce y media en parte, la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.

#### **4.1.1. Participación de la vía de señalización de la MAPK**

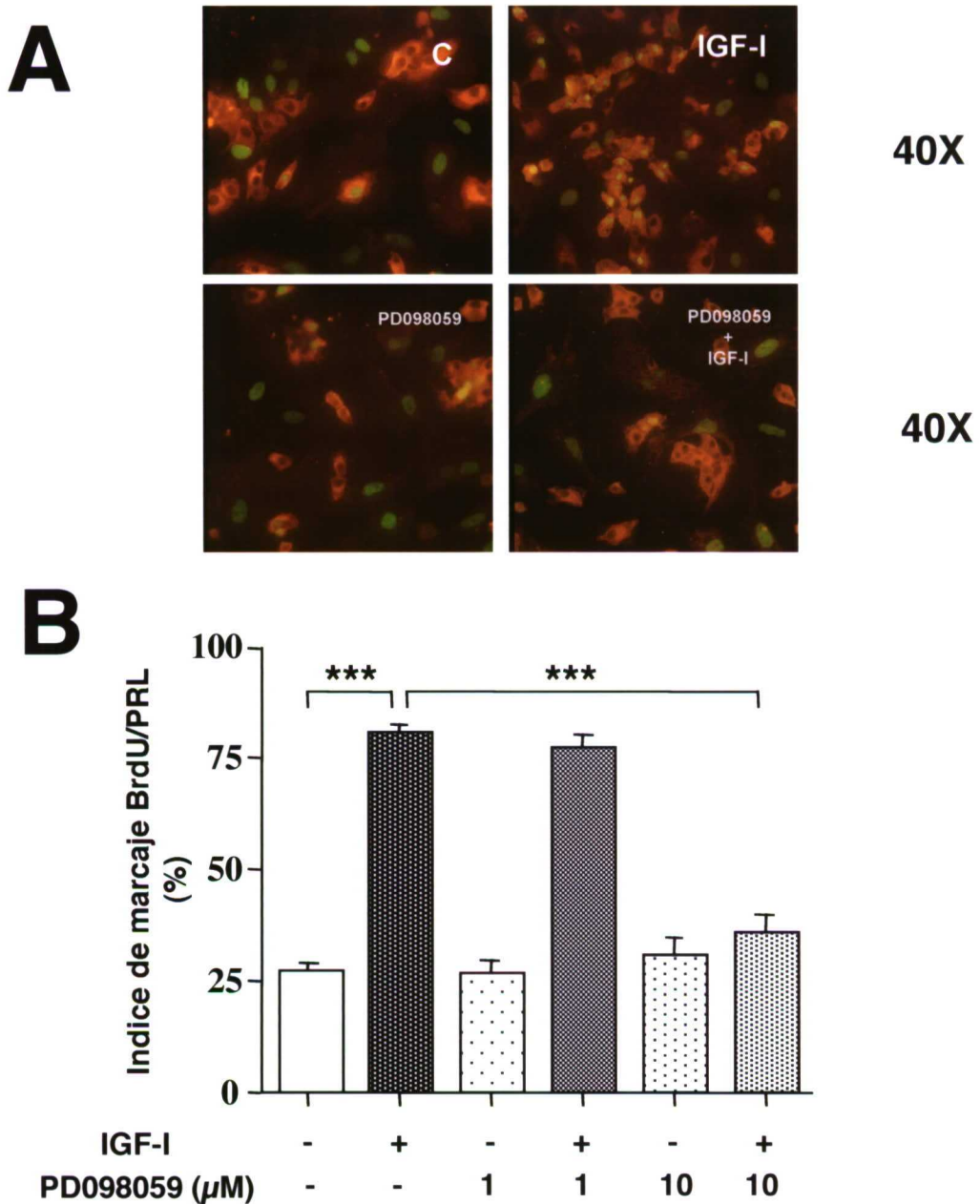
Para comprobar si la vía Ras/MAPK participa en la acción proliferativa de las células lactotropas inducida por IGF-I, se utilizó PD098059, inhibidor que bloquea selectivamente la actividad MAPKK (MEK 1/2).

El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de PD098059 a una concentración final de 1  $\mu$ M y 10

$\mu\text{M}$ . A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante un periodo de 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. BrdU [ $10 \mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL. La detección de BrdU se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína marcando los núcleos en verde, y para las células lactotropas un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, apareciendo los citoplasmas en rojo.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 10, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. Se observa que la presencia del inhibidor de la vía MAPK, a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ , reduce significativamente el efecto mitogénico de IGF-I sobre las células lactotropas. Además, en general hay menor número de células lactotropas. La ausencia de interferencia del inhibidor se demuestra porque no se observan diferencias entre los grupos tratados con el inhibidor y los controles. En el panel B se representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos, BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Se confirma la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas y además, se observa que el efecto de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas es inhibido totalmente por PD098059 a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  pero no a la concentración inferior de  $1 \mu\text{M}$ . La presencia del inhibidor, a cualquiera de las concentraciones estudiadas, no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos confirman que **la vía Ras/MAPK es determinante en la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas.**



**Figura 10. Efecto del bloqueo de la vía MAPK sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.** El crecimiento celular se sincronizó manteniendo las células en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron preincubadas en presencia del inhibidor PD098059 a dosis final de  $[1 \mu\text{M}]$  y  $[10 \mu\text{M}]$  durante 45 minutos. A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I  $[10^{-7}\text{M}]$  durante un periodo de 48 horas. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU  $[10 \mu\text{M}]$  24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** El panel muestra una doble inmunofluorescencia de células hipofisarias en presencia de IGF-I  $[10^{-7}\text{M}]$ , PD098059  $[10 \mu\text{M}]$  o de ambos durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-BrdU para la detección de la proliferación celular (núcleo marcado en color verde) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en color rojo).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=3$ ), \*\*\*,  $p<0,001$ .

#### 4.1.2. Participación de la vía de señalización de la PKA

Como se ha comentado anteriormente, la vía AMPc/PKA juega un papel muy importante en la proliferación de las células lactotropas (Suzuki, 1999). Además, habíamos comprobado la participación de VIP en la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I (Figura 7). Todo ello nos llevó al estudio de la implicación de esta vía en la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.

Para ello se inactivó la vía de la PKA con el Rp-cAMPS, antagonista competitivo del AMPc que actúa bloqueando la subunidad catalítica de la enzima.

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de Rp-cAMPS a una concentración final de 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante un periodo de 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. BrdU [10  $\mu$ M] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11A, donde se representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Se observa que la presencia del inhibidor de la PKA, a una concentración de 10  $\mu$ M, abole parcialmente la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas, mientras que no tuvo efecto a la concentración inferior de 1  $\mu$ M. La presencia del inhibidor a cualquiera de las concentraciones estudiadas, no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos indican que **la vía PKA participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas.**

#### **4.1.3. Participación de la vía de señalización de la PI3'-Kinasa**

Estudios previos indican que la activación de la vía Akt/PKB, además de mediar efectos metabólicos de IGF-I, protege a las células de la apoptosis (Downward, 1998). Además, se ha sugerido que la vía PI3'-Kinasa podría mediar acciones proliferativas (Scrimgeour, 1997; Dufourny, 1997).

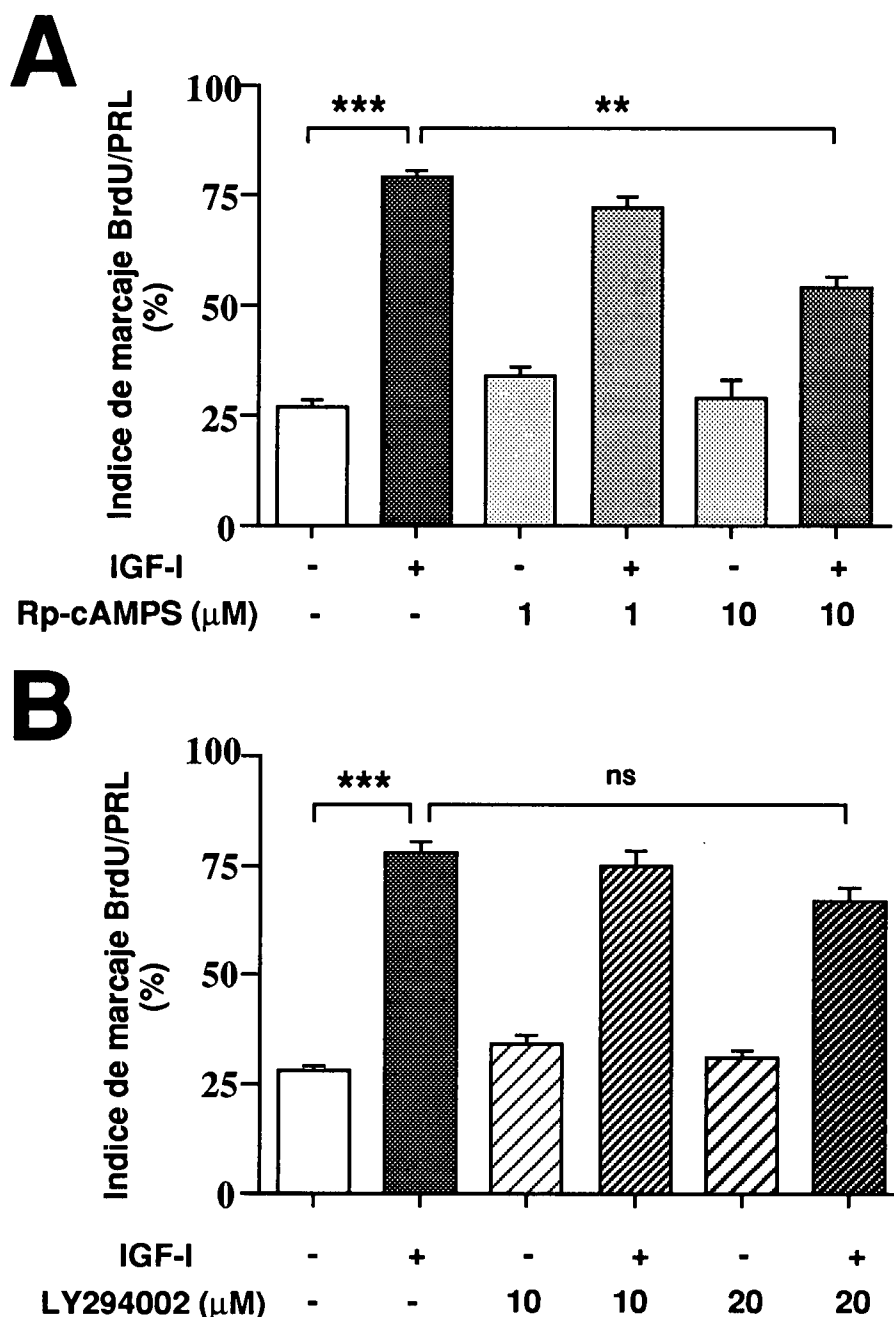
Para comprobar si la vía PI3'-Kinasa participa en la acción proliferativa de las células lactotropas inducida por IGF-I, se utilizó LY294002, inhibidor sintético que bloquea específicamente la PI3'-Kinasa.

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de LY294002 a una concentración final de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M. A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante un periodo de 48 horas. Otros grupos recibieron sólo el inhibidor. BrdU [10  $\mu$ M] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 11B donde se observa que la presencia del inhibidor de la vía PI3'-Kinasa no tiene efecto sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I a ninguna de las concentraciones estudiadas.

**Estos datos indican que la vía PI3'-Kinasa no participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas.**





**Figura 11. Efecto del bloqueo de la vía PKA y PI3'-Kinasa sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I.** Una vez sincronizado el crecimiento celular, las células fueron preincubadas en presencia del inhibidor Rp-cAMPS a dosis de [1 μM] y [10 μM] que bloquea la PKA y con LY294002 a dosis final de [10 μM] y [20 μM] que bloquea la vía PI3'-Kinasa. A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I [10<sup>-7</sup>M] durante un periodo de 48 horas. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [10 μM] 24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas, en presencia de un inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas, en presencia de un inhibidor de la vía PI3'-Kinasa (LY294002).

Los valores representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), \*\*,p<0,01, \*\*\*,p<0,001, ns, no significativo.

## **4.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA con inhibidores específicos sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por VIP**

VIP ejerce sus funciones principalmente a través del aumento en la síntesis de AMPc y la activación de la PKA. Además, se ha evidenciado el importante papel que tiene el AMPc en la proliferación de las células lactotropas (Suzuki, 1999).

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de clarificar el mecanismo por el cual VIP promueve la proliferación de las células lactotropas.

### **4.2.1. Participación de la vía de señalización de la PKA**

Para comprobar si la vía AMPc/PKA participa en la acción proliferativa de las células lactotropas inducida por VIP, se utilizó Rp-cAMPS, antagonista competitivo del AMPc que actúa bloqueando la subunidad catalítica de la enzima.

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de Rp-cAMPS a una concentración final de 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. A continuación, las células se mantuvieron con VIP [ $10^{-7}$ M] durante un periodo de 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. BrdU [10  $\mu$ M] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento. Tras el periodo de incubación, se procedió al análisis mediante técnicas de doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-BrdU y anti-PRL.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12A donde se representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Se observa que la presencia del inhibidor de la PKA, a una concentración de 10  $\mu$ M, abole completamente el efecto mitogénico de VIP sobre las células lactotropas, mientras que no tuvo efecto a la concentración inferior de 1  $\mu$ M. Los resultados

confirman que el inhibidor, a cualquiera de las concentraciones estudiadas, no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos confirman que **la vía AMPc/PKA es determinante en la acción proliferativa de VIP sobre las células lactotropas.**

#### **4.2.2. Participación de la vía de señalización de la MAPK**

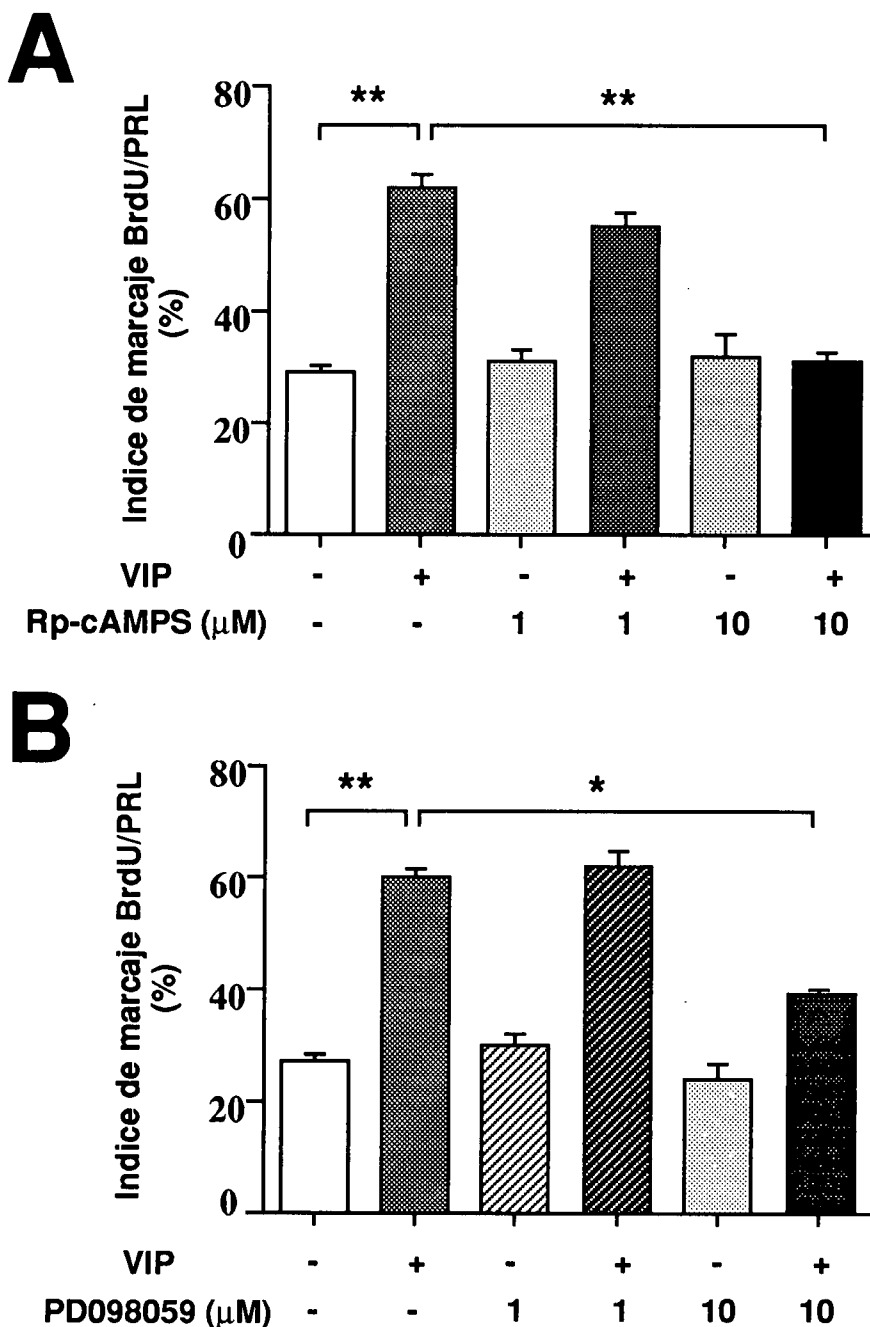
Estudios previos han sugerido que la estimulación de la proliferación inducida por el aumento de los niveles de AMPc, podría requerir de la activación de la vía MAPK (Suzuki, 1999; Kimura, 2001).

Para comprobar si la vía MAPK participa en la acción proliferativa de las células lactotropas inducida por VIP, se utilizó PD098059, inhibidor que bloquea selectivamente la actividad MAPKK (MEK 1/2).

Siguiendo el diseño experimental anterior, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia de PD098059 a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . A continuación, las células se mantuvieron con VIP [ $10^{-7}$  M] durante un periodo de 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. BrdU [10  $\mu\text{M}$ ] se añadió a los cultivos 24 horas antes de finalizar el experimento.

Los datos obtenidos se muestran en la Figura 12B donde se representa el porcentaje de las células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL del total de las células lactotropas contadas. Se observa que la presencia del inhibidor de la vía MAPK, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , reduce parcialmente la acción proliferativa de VIP sobre las células lactotropas, mientras que no tuvo efecto a la concentración inferior de 1  $\mu\text{M}$ . El inhibidor sólo no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos indican que **la vía MAPK participa en la acción mitogénica de VIP sobre las células lactotropas.**



**Figura 12. Efecto del bloqueo de la vía PKA y MAPK sobre la proliferación de las células lactotropas inducida por VIP.** Una vez sincronizado el crecimiento celular, las células fueron preincubadas en presencia del inhibidor Rp-cAMPS a concentración final de [1 μM] y [10 μM] que bloquea la PKA y de PD098059 a concentración final de [1 μM] y [10 μM] que bloquea la vía MAPK. A continuación, las células se mantuvieron con IGF-I [10<sup>-7</sup>M] durante un periodo de 48 horas. Para la cuantificación de la proliferación celular se añadió al cultivo BrdU [10 μM] 24 horas antes de finalizar el experimento.

**A:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas, en presencia de un inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS).

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos BrdU y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas, en presencia de un inhibidor de la vía MAPK (PD098059). Los valores representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), \*, p<0,05, \*\*, p<0,01.

## **5. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE IGF-I SOBRE LAS CÉLULAS HIPOFISARIAS**

Como se ha demostrado en apartados anteriores, IGF-I induce la proliferación de las células hipofisarias, concretamente de las células lactotropas. Además, la vía MAPK juega un papel muy importante en la proliferación de las células lactotropas. Se ha demostrado también que la vía PI3'-Kinasa no parece participar en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas, aunque podría mediar efectos de IGF-I sobre supervivencia celular (Kulik, 1997; Dudek, 1997).

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de comprobar la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) y de la PI3'-Kinasa (Akt) y su cinética en función del tiempo de exposición al estímulo.

### **5.1. Efecto de IGF-I sobre la activación de la vía MAPK: estudio tiempo-respuesta**

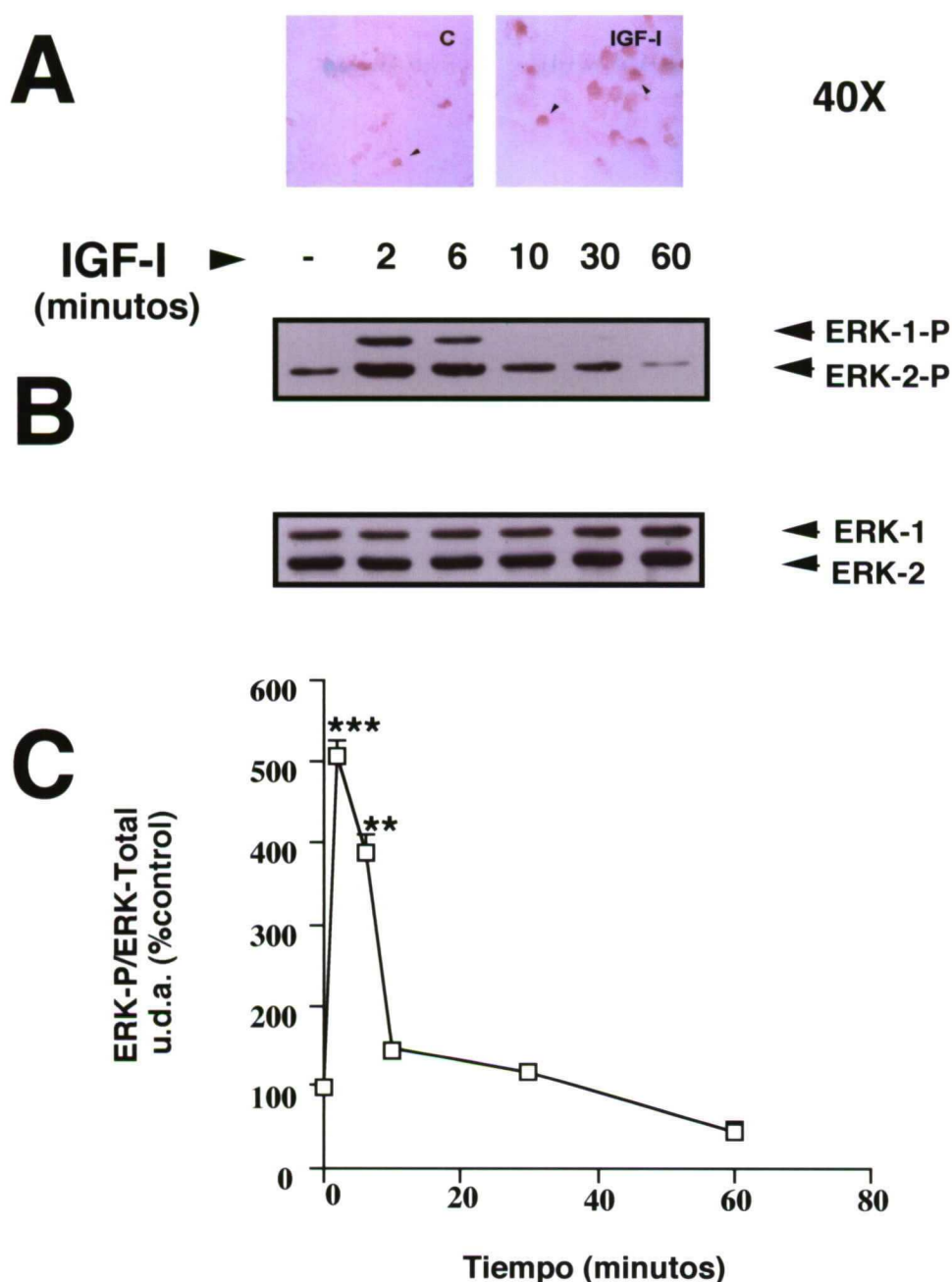
En estudios previos de nuestro laboratorio habíamos evidenciado la activación de la MAPK (ERK 1/2) por IGF-I en una línea celular productora de PRL, las células GH4C1.

Para comprobar la activación de la vía MAPK, células hipofisarias de rata se preincubaron y mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30 y 60 minutos. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma en que se explicó anteriormente y utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Para tener una comprobación morfológica de la activación de la vía MAPK como consecuencia de la acción de IGF-I, se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos. Para ello se emplearon placas multipocillo y las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Posteriormente, se procedió a la fijación

del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos empleando anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Para su detección se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina que produce color rojo en las células que presentan formas activadas de MAPK (ERK 1/2).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células hipofisarias tratadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos, se observa un claro aumento en el número de células con formas fosforiladas y activadas de MAPK/ERKs con respecto a los controles no tratados. En la Figura 13B se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de ERK 1/2, en células hipofisarias incubadas en presencia de IGF-I durante distintos tiempos. En la Figura 13C se muestra la cuantificación densitométrica de dichas proteínas, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una activación muy rápida de ERK 1/2 por IGF-I con un pico máximo a los 2 minutos y que regresa a los niveles basales a los 10 minutos.

Estos resultados confirman que **la vía de señalización MAPK (ERK 1/2) se activa en presencia de IGF-I en las células hipofisarias, y que por tanto esta vía estaría implicada en la acción de IGF-I sobre proliferación celular.**



**Figura 13. Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la activación de la vía MAPK/ERKs.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30 y 60 minutos.

**A:** El panel muestra una inmunocitoquímica con fosfatasa alcalina de células hipofisarias en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Se utilizó un anticuerpo anti-MAPK para detectar las formas activadas de esta quinasa (color rojo).

**B:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/ 2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**C:** Cuantificación densitométrica de la ERK 1/ 2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 5.2. Efecto de IGF-I sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa: estudio tiempo-respuesta

El procedimiento experimental para comprobar si IGF-I activaba la vía PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias, fue semejante al descrito anteriormente. Las células se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30, 60 120 y 180 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt. En la Figura 14B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una activación muy rápida de Akt por IGF-I que se mantiene en niveles muy elevados hasta los 60 minutos, momento en que se produce un paulatino descenso, permaneciendo a las 2 horas una activación valorable.

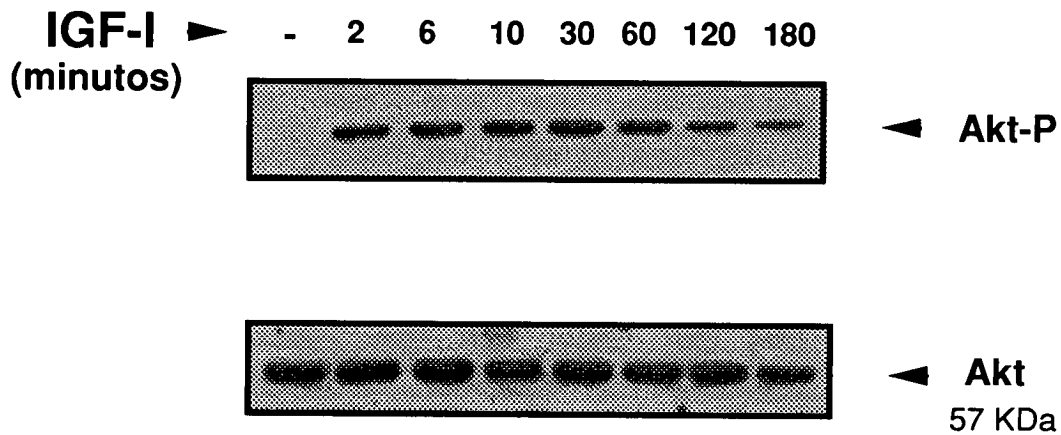
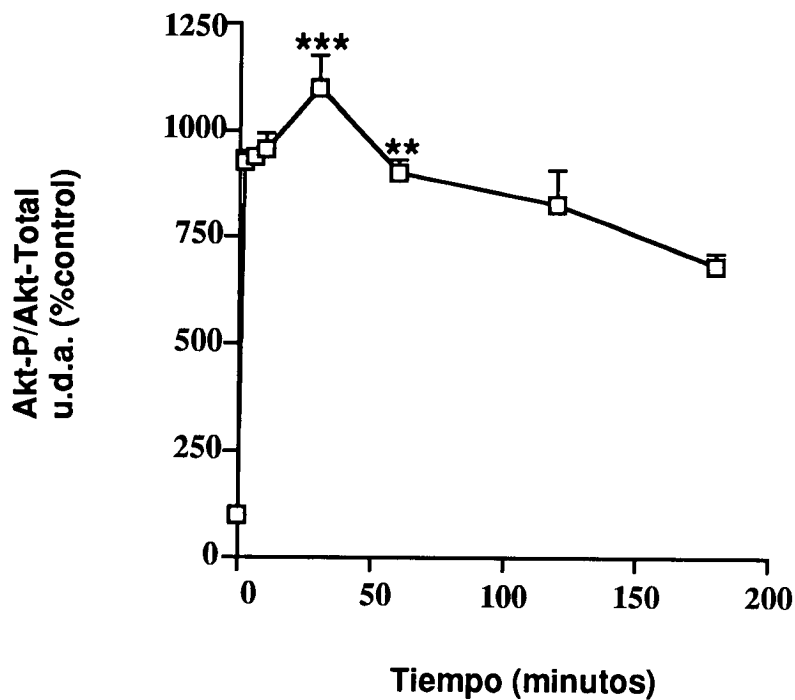
Estos resultados indican que **la vía de señalización PI3'-Kinasa/Akt se activa en presencia de IGF-I en las células hipofisarias, y que por tanto es una ruta importante en la mediación de determinados efectos.**

Para comprobar si la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt por IGF-I, se bloquea específicamente por el inhibidor LY294002, las células se preincubaron con este inhibidor a una concentración final de 20  $\mu$ M durante 45 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt. En la Figura 15B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. La presencia del inhibidor sólo, no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.



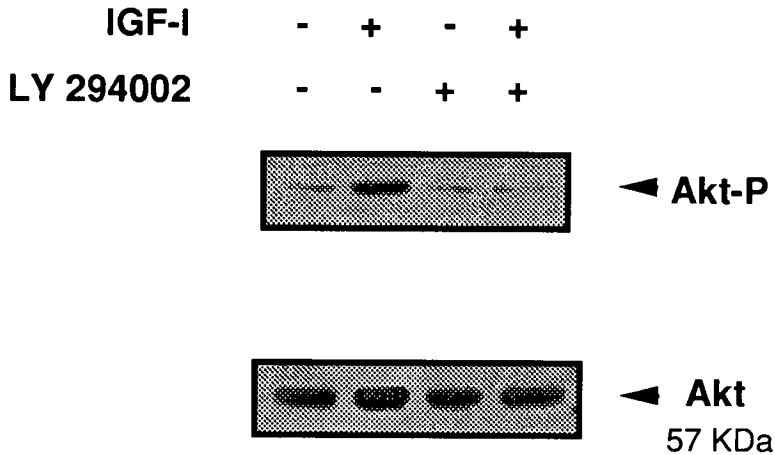
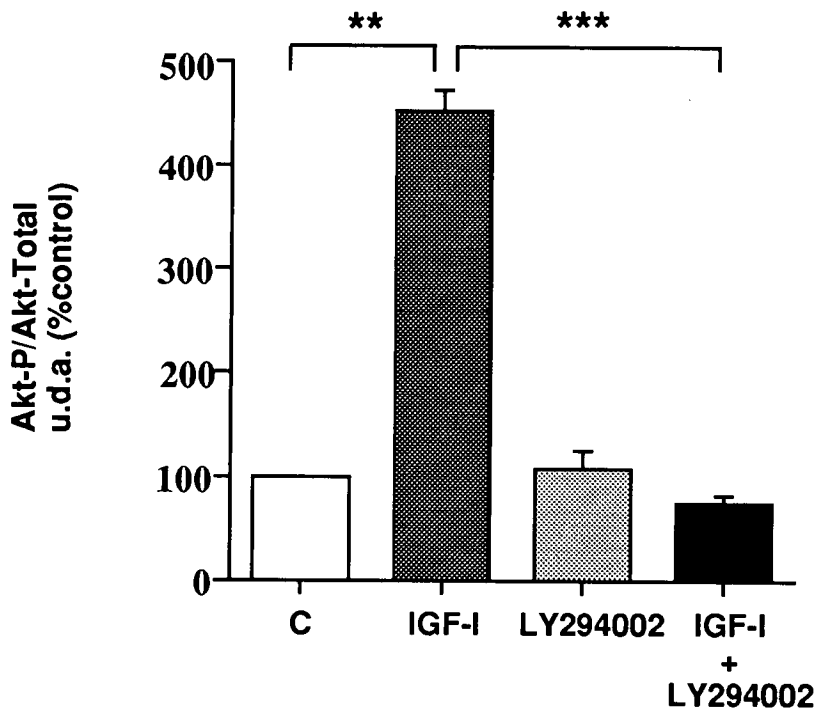
Se observa que la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt por IGF-I, se bloquea específicamente en presencia del inhibidor LY294002, lo que avala la especificidad de dicha activación.

**A****B**

**Figura 14. Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa.** Las células hipofisarias se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30, 60, 120 y 180 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt (Ser<sup>473</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-Akt que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

**A****B**

**Figura 15. Efecto del bloqueo de la vía PI3'-Kinasa sobre la activación de la Akt/PKB inducida por IGF-I.** Las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con LY294002 [20  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 2 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt (Ser<sup>473</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-Akt que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. (n=2), \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

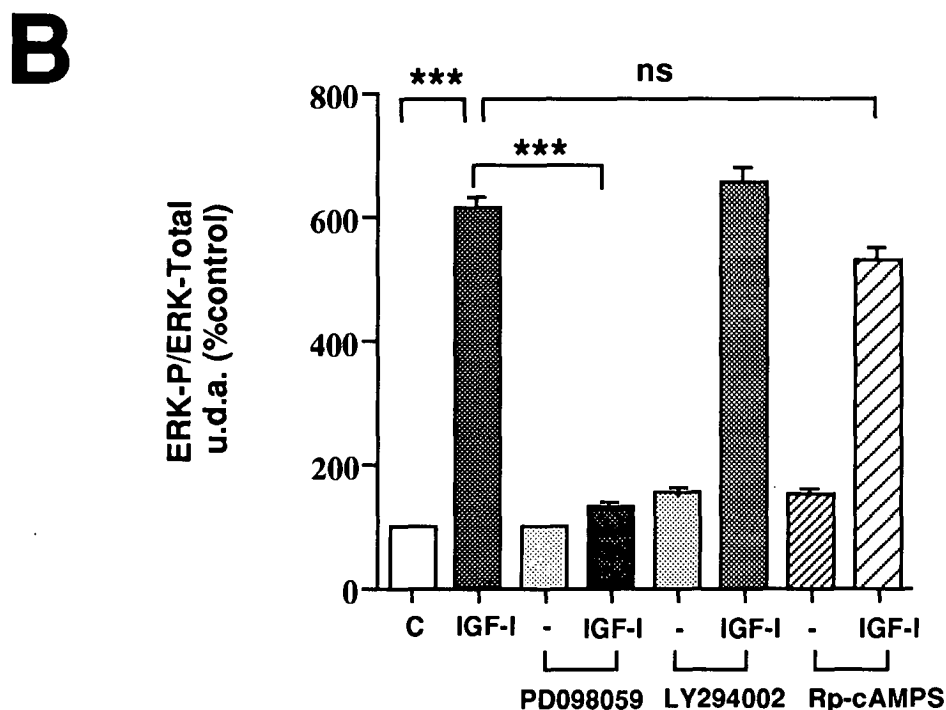
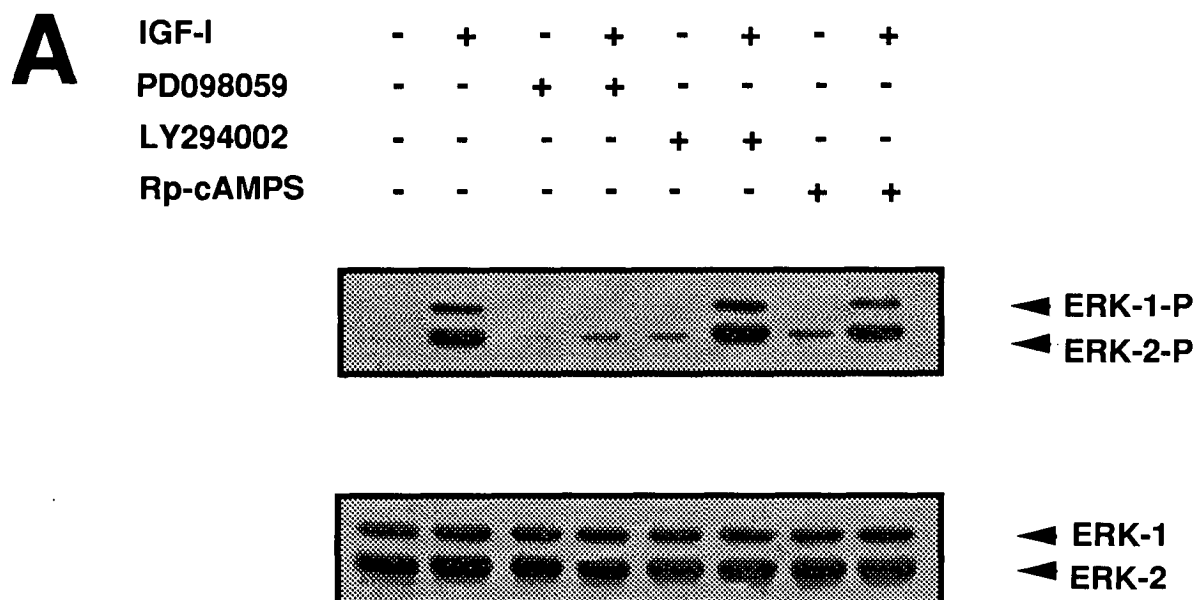
### 5.3. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PI3'-Kinasa y PKA sobre la activación de la vía MAPK/ERKs inducida por IGF-I

Dado el importante papel que tiene la vía MAPK en la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I, nos planteamos estudiar la posible influencia de otras vías de señalización como la PI3'-Kinasa y la PKA sobre la activación de MAPK (ERK 1/2) en respuesta a IGF-I. En estudios recientes se sugiere que puede existir interacción entre la vía MAPK (ERK 1/2) y PI3'-Kinasa/Akt (Zimmermann, 1999). Además, como hemos demostrado en el presente trabajo la PKA participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas, por lo tanto quisimos comprobar si existía alguna interacción entre la PKA y la activación de ERK 1/2.

Las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M], LY294002 [20  $\mu$ M] y Rp-cAMPS [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 2 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). En la Figura 16B se muestra la cuantificación densitométrica de dichas proteínas, en porcentaje respecto al grupo control. Estos resultados muestran que PD098059 bloquea específicamente la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por IGF-I. El bloqueo de las vías PI3'-Kinasa y PKA no afecta a la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por IGF-I. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos indican que **IGF-I induce directamente la activación de ERK 1/2 a través de Ras/Raf/MEK, sin depender de otras vías.**



**Figura 16. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, PI3'-Kinasa y PKA sobre la activación de las ERK-1 y ERK-2 de la vía MAPK inducida por IGF-I.** Las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con PD098059 [10  $\mu$ M], LY294002 [20  $\mu$ M] o Rp-cAMPS [10  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 2 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/ 2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de la ERK 1/ 2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*\*, p < 0,001, ns, no significativo.

## **6. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE VIP SOBRE LAS CÉLULAS HIPOFISARIAS**

Como se ha demostrado anteriormente, la vía AMPc/PKA tiene un papel muy importante en el efecto mitogénico inducido por VIP. Además, hemos visto que la vía MAPK participa en la acción proliferativa de VIP sobre las células lactotropas. En estudios previos se ha demostrado que AMPc/PKA promueven la activación de la vía MAPK en diferentes tipos celulares a través de la GTPasa Rap1 (Frödin, 1994; Vossier, 1997; Kievit, 2001). Parece ser que el efecto del AMPc sobre la vía MAPK depende del tipo celular y el tipo de receptor tirosina quinasa (Calleja, 1997). Por otro lado, estudios recientes han sugerido que el AMPc, a través de su unión a proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), podría conducir a la activación de otras vías de señalización, como la PI3'-Kinasa (Richards, 2001).

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de comprobar si VIP induce cambios en la activación de las vías MAPK (ERK 1/2) y PI3'-Kinasa/Akt. Además, si esto se confirmara, se analizaría si se produce a través de la vía AMPc/PKA.

### **6.1. Efecto de VIP sobre la activación de la vía MAPK: estudio tiempo-respuesta**

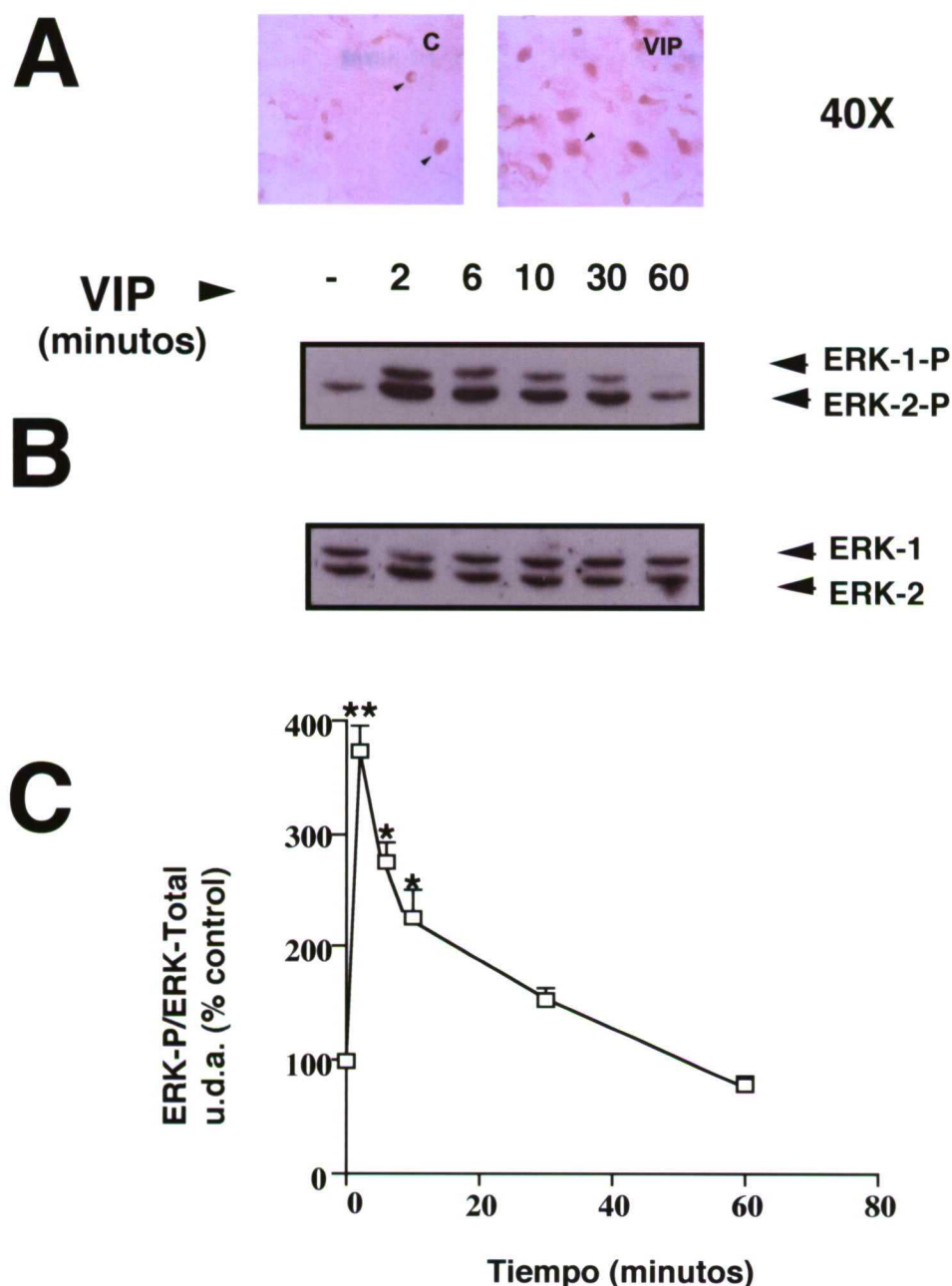
Se ha visto recientemente que VIP activa la vía MAPK/ERKs en una línea celular productora de PRL (células GH4C1) (Le Péchon-Vallée, 2000).

Para comprobar la activación de la vía MAPK, células hipofisarias de rata se preincubaron y mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30 y 60 minutos. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma en que se explicó anteriormente y utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Para tener una comprobación morfológica de

la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) como consecuencia de la acción de VIP, se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos. Para ello se emplearon placas multipocillo y las células se incubaron en presencia o no de VIP [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos empleando anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Para su detección se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina que produce color rojo en las células que presentan formas activadas de MAPK (ERK 1/2).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, donde el panel A muestra imágenes correspondientes a células hipofisarias incubadas en presencia o no de VIP [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. En las células tratadas con VIP se observa un claro aumento en el número de células con formas fosforiladas y activadas de MAPK/ERKs con respecto a los controles no tratados. En la Figura 17B se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de ERK 1/2, en células hipofisarias incubadas en presencia de VIP durante distintos tiempos. En la Figura 17C se muestra la cuantificación densitométrica de dichas proteínas, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una activación muy rápida de ERK 1/2 por VIP, con un pico máximo a los 2 minutos y que fue disminuyendo progresivamente hasta regresar a los niveles basales a los 60 minutos, pero permaneciendo con niveles altos de activación durante 10 minutos.

Estos resultados indican que **VIP activa la vía MAPK (ERK 1/2) en células hipofisarias, y que por tanto esta vía podría estar implicada en la acción de VIP sobre proliferación celular.**



**Figura 17. Estudio tiempo-respuesta del efecto de VIP sobre la activación de la vía MAPK/ERKs.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron con VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 2, 6, 10, 30 y 60 minutos.

**A:** El panel muestra una inmunocitoquímica con fosfatasa alcalina de células hipofisarias en presencia o no de VIP [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Se utilizó un anticuerpo anti-MAPK para detectar las formas activadas de esta quinasa (color rojo).

**B:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/ 2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**C:** Cuantificación densitométrica de la ERK 1/ 2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. (n=2), \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ .

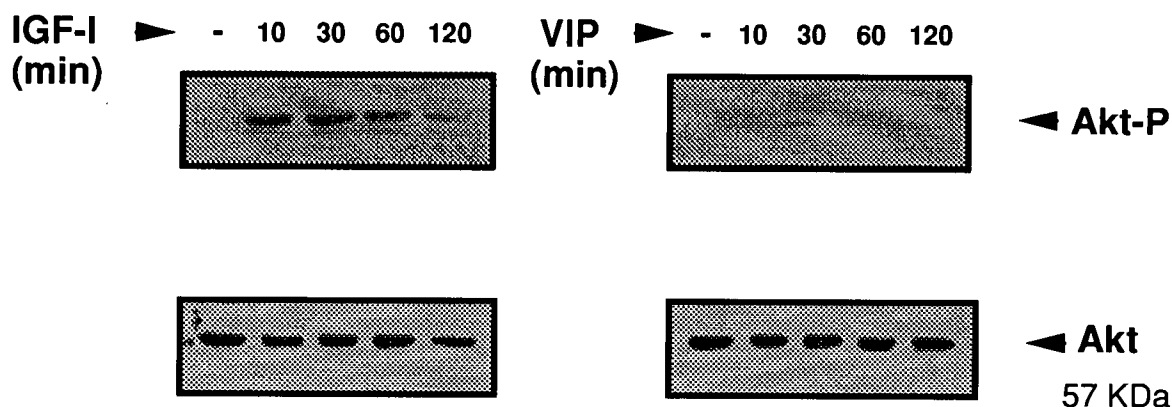
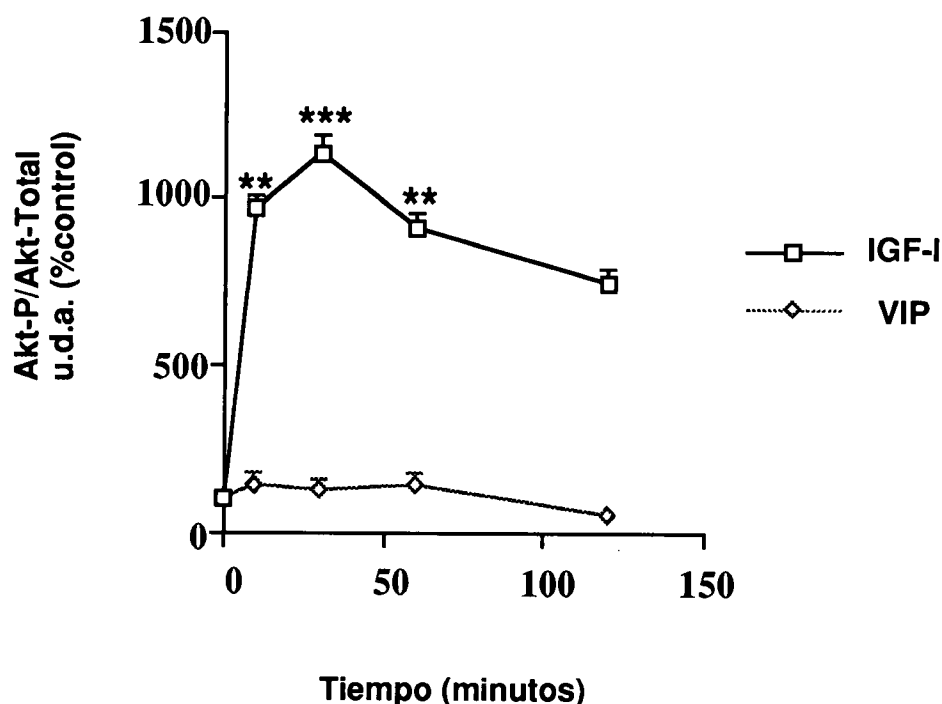


## 6.2. Efecto de VIP sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa: estudio tiempo-respuesta

El procedimiento experimental para comprobar si VIP activaba la vía PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias, fue semejante al descrito anteriormente. Las células se incubaron en presencia de VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 10, 30, 60 y 120 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] o de VIP [ $10^{-7}$  M]. En la Figura 18B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa, como se ha descrito anteriormente, que IGF-I activa la vía PI3'-Kinasa en células hipofisarias, pero VIP no tiene efecto sobre esta ruta.

Estos resultados indican que **no hay interacción del AMPc con la vía de señalización PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias, y que por tanto es una ruta que no parece mediar efectos de VIP.**

**A****B**

**Figura 18. Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I Y VIP sobre la activación de la vía PI3'-Kinasa.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 10, 30, 60 y 120 minutos.

**A:** Autorradiografías representativas de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Akt (Ser<sup>473</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-Akt que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de Akt, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. (n=2), \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001.

### 6.3. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de la vía MAPK/ERKs inducida por VIP

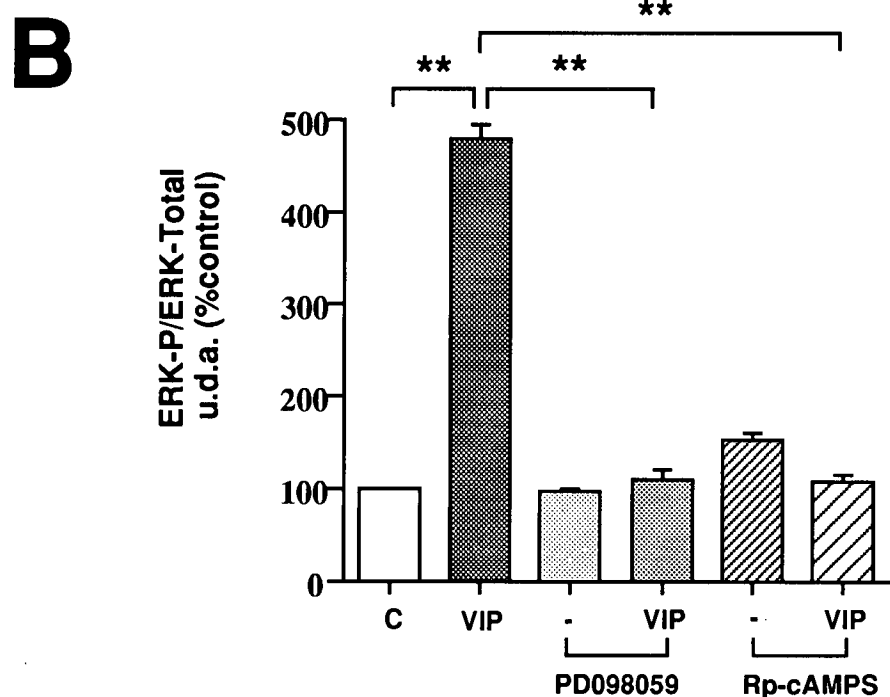
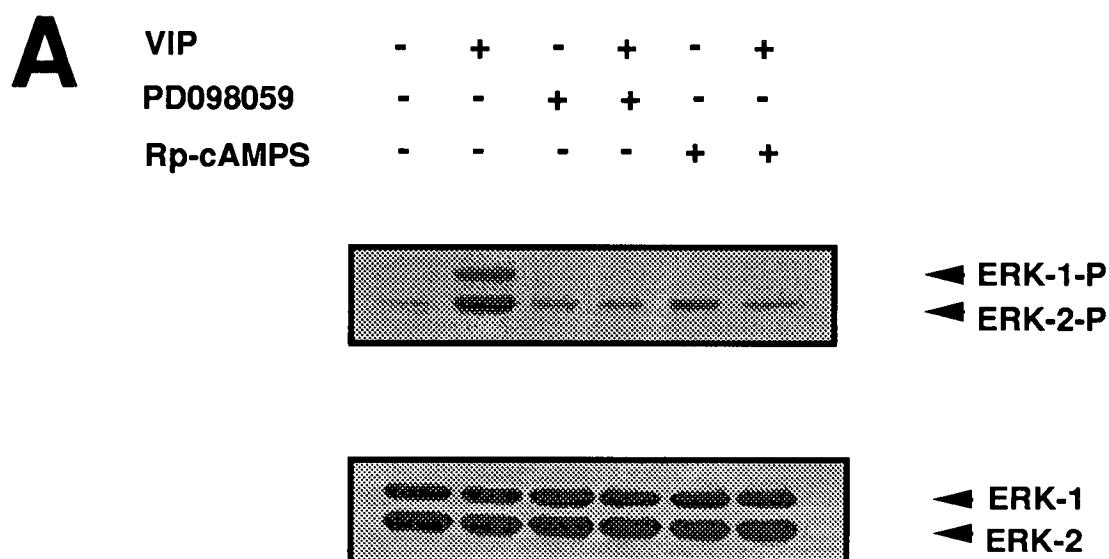
Como hemos demostrado en el presente trabajo, VIP activa la vía MAPK (ERK 1/2) en las células hipofisarias. Además, se ha visto que en la línea celular GH4C1, éste efecto está mediado a través de la PKA (Le Péchon-Vallée, 2000). Apoyando estos datos, estudios recientes han demostrado que en otra línea celular secretora de PRL (células GH3), la PKA se requiere para la activación de ERK 1/2 inducida por AMPc (Kievit, 2001). Este trabajo, además, indica que Rap1 jugaría un papel importante en mediar la activación de MAPK inducida por AMPc.

Por todo ello, nos planteamos estudiar si VIP, a través de la PKA podría interaccionar con la vía MAPK en las células hipofisarias.

Para ello, las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M] y Rp-cAMPS [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió VIP [ $10^{-7}$  M] durante 2 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). En la Figura 19B se muestra la cuantificación densitométrica de dichas proteínas, en porcentaje respecto al grupo control. Estos resultados muestran que PD098059 y Rp-cAMPS bloquean específicamente la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por VIP. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos datos indican que **VIP induce la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) a través de la activación de la vía AMPc/PKA.**



**Figura 19. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de las ERK-1 y ERK-2 de la vía MAPK inducida por VIP.** Las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con PD098059 [10  $\mu$ M] o Rp-cAMPS [10  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 2 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-MAPK que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de la ERK 1/2, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*, p<0,01.

## **7. ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL CREB**

Uno de los factores transcripcionales activados por estímulos extracelulares mejor caracterizado es CREB. Estudios previos han demostrado que CREB regula la transcripción génica de numerosos genes, en respuesta a diversos estímulos (Shaywitz y Greenberg, 1999). CREB es activado por una variedad de proteínas quinasas entre las que se incluyen la PKA y la MAPK. Estas quinasas fosforilan CREB en un residuo particular, serina 133 (Ser<sup>133</sup>) (Montminy, 1997; Ginty, 1994; Xing y Greenberg, 1996; Hansen, 1999). Además, se ha visto que la fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) es crítica y necesaria pero no suficiente para la inducción de genes de expresión temprana por los factores de crecimiento (Ginty, 1994; Bonni, 1995). Así, el reclutamiento y la activación de determinados coactivadores que se asocian a CREB, y la interacción con otros factores de transcripción, regulan la capacidad de CREB para inducir la expresión de genes específicos en respuesta a un estímulo determinado (Shaywitz y Greenberg, 1999).

Como habíamos observado que la activación de las vías AMPc/PKA y MAPK era necesaria para inducir la proliferación de las células lactotropas, nos planteamos analizar la secuencia de cambios en la fosforilación y activación de CREB (Ser<sup>133</sup>) en función del tiempo de exposición a IGF-I o a VIP. Además, para comprobar si la activación de CREB se producía en las células lactotropas, se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos.

### **7.1. Estudio del efecto de IGF-I sobre la activación de CREB**

#### **7.1.1. Efecto de IGF-I sobre la activación de CREB: estudio tiempo-respuesta**

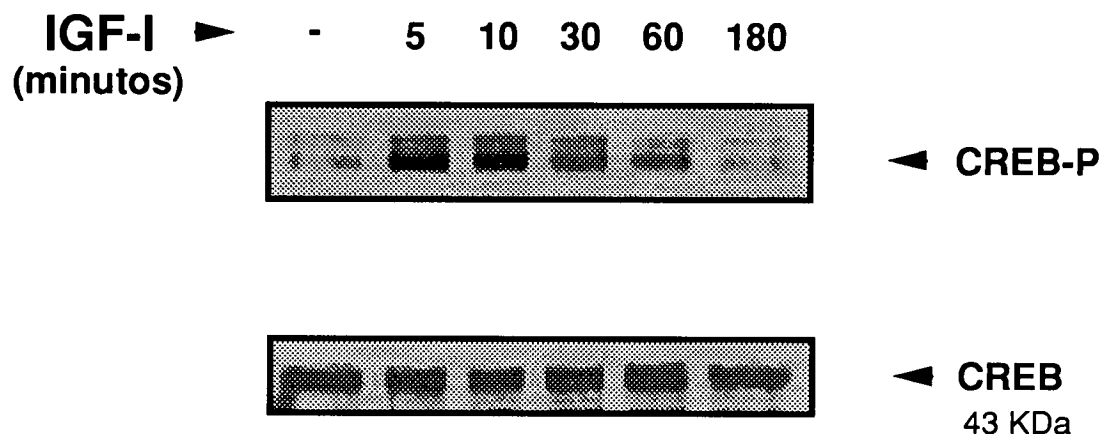
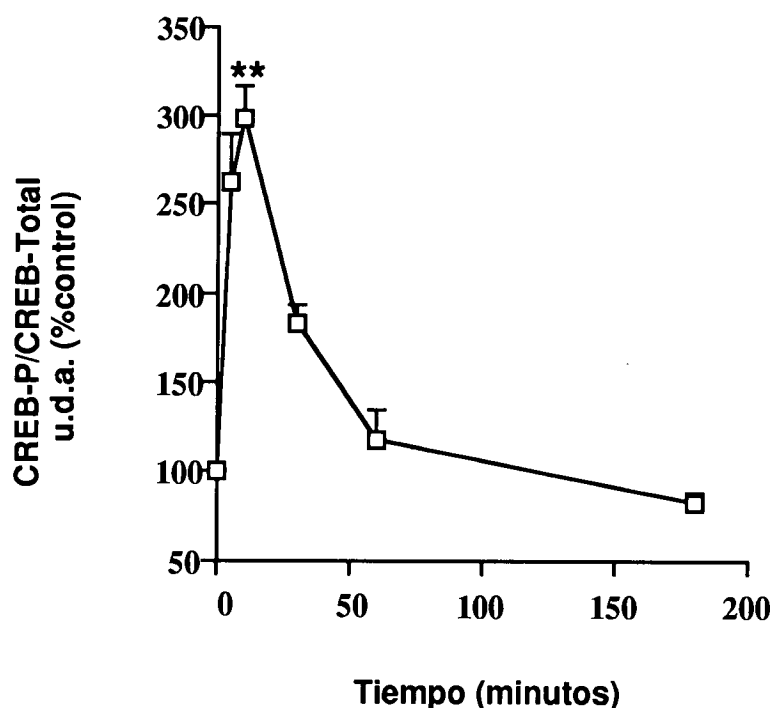
Estudios previos han definido un mecanismo por el cual los factores de crecimiento transmiten señales al núcleo para activar la expresión génica. Así, se ha demostrado que Ras/MAPK activa la quinasa Rsk2, la cual media la

fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) inducida por los factores de crecimiento (Xing, 1996).

Para comprobar la activación de CREB por IGF-I, las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60 y 180 minutos. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma en que se explicó anteriormente y utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>).

En la Figura 20, en el panel A se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot de CREB (Ser<sup>133</sup>), en células hipofisarias incubadas en presencia de IGF-I durante distintos tiempos. En la Figura 20B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una activación rápida de CREB por IGF-I con un pico máximo a los 10 minutos, que regresa a los niveles basales a los 60 minutos.

**Estos resultados muestran que IGF-I activa CREB (Ser<sup>133</sup>) en las células hipofisarias, lo que indica su participación en la regulación de la transcripción génica inducida por este factor de crecimiento.**

**A****B**

**Figura 20. Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la activación de CREB.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60 y 180 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-CREB que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

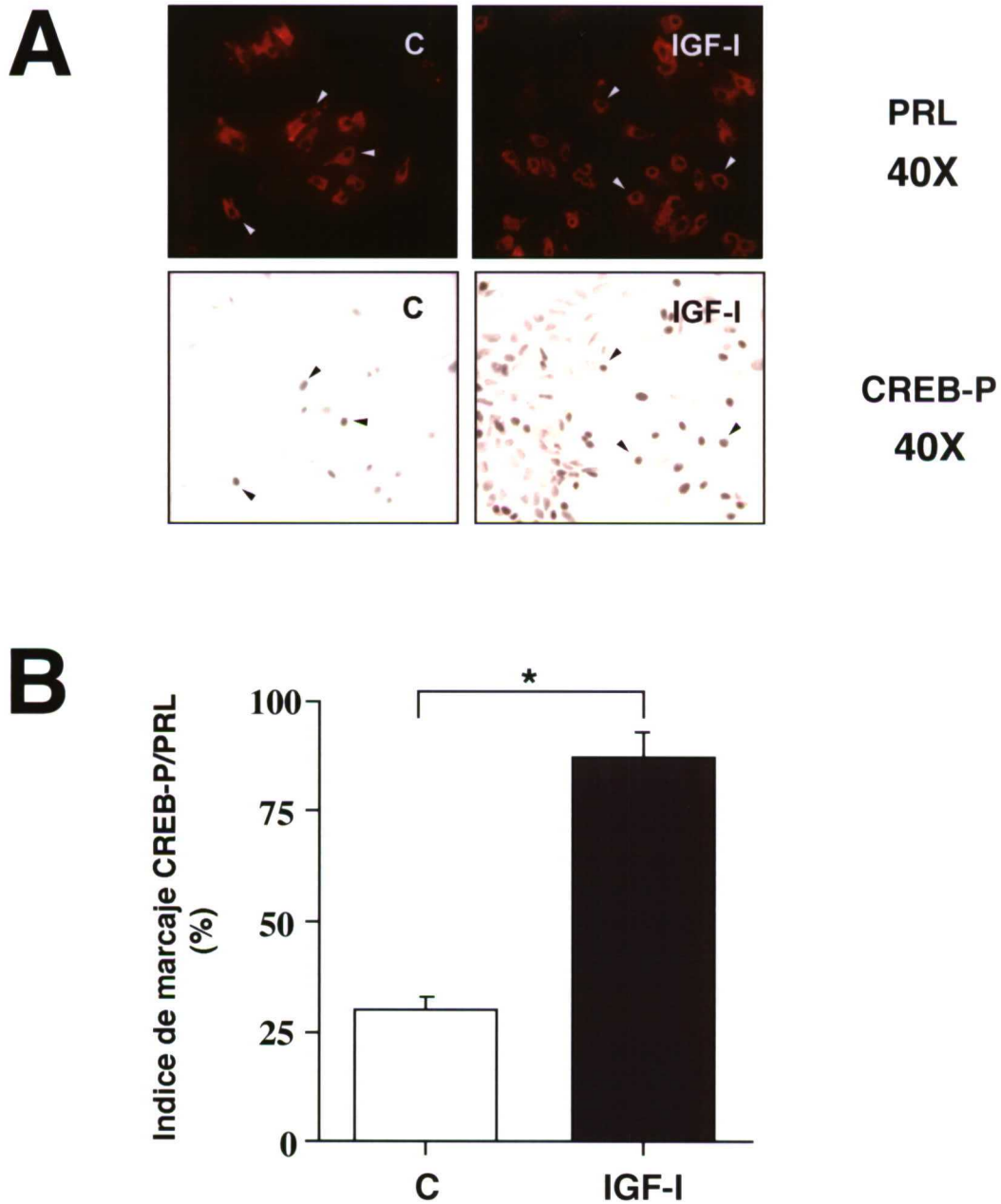
**B:** Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*, p<0,01.

Para verificar si CREB era activado en las células lactotropas como consecuencia de la acción de IGF-I, se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos. Para ello, se emplearon placas multipocillo y las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos con doble marcaje, para reconocer las formas fosforiladas de CREB y las células lactotropas. La detección de CREB-P se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con biotina marcando los núcleos en marrón, y para la identificación de las células lactotropas un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, apareciendo los citoplasmas en rojo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células hipofisarias tratadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M] se observa un claro aumento en el número de células lactotropas en las cuales CREB es activado (indicado con las cabezas de flecha), con respecto a los controles no tratados. En el panel B se representa el porcentaje de células inmunoreactivas para ambos CREB-P y PRL del total de células lactotropas contadas. Se observa que IGF-I incrementa significativamente el índice de marcaje CREB-P/PRL.

**Estos datos demuestran que IGF-I induce la activación de CREB en las células lactotropas, lo cual sugiere que CREB participa en la acción mitogénica de este factor de crecimiento.**





**Figura 21. Efecto de IGF-I sobre la activación del factor transcripcional CREB en las células lactotropas.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 10 minutos.

**A:** El panel muestra una doble inmunocitoquímica de células hipofisarias en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 10 minutos. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de las formas fosforiladas (núcleo marcado en color marrón) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en rojo). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB correspondientes a las células lactotropas que están señaladas en el panel superior.

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos CREB y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=2$ ), \*,  $p<0,05$ .

### 7.1.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de CREB inducida por IGF-I

Los resultados previos muestran que IGF-I activa CREB (Ser<sup>133</sup>) en las células hipofisarias, y que una de las poblaciones en la cual se induce la activación de este factor transcripcional, es en las células lactotropas. Estos datos sugieren que CREB participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas. Además, habíamos demostrado que IGF-I necesita la activación de las vías MAPK/ERKs y PKA para inducir su acción mitogénica.

Por todo ello, nos planteamos comprobar si existía interdependencia entre las vías de señalización MAPK (ERK 1/2) y la PKA en la activación de CREB inducida por IGF-I.

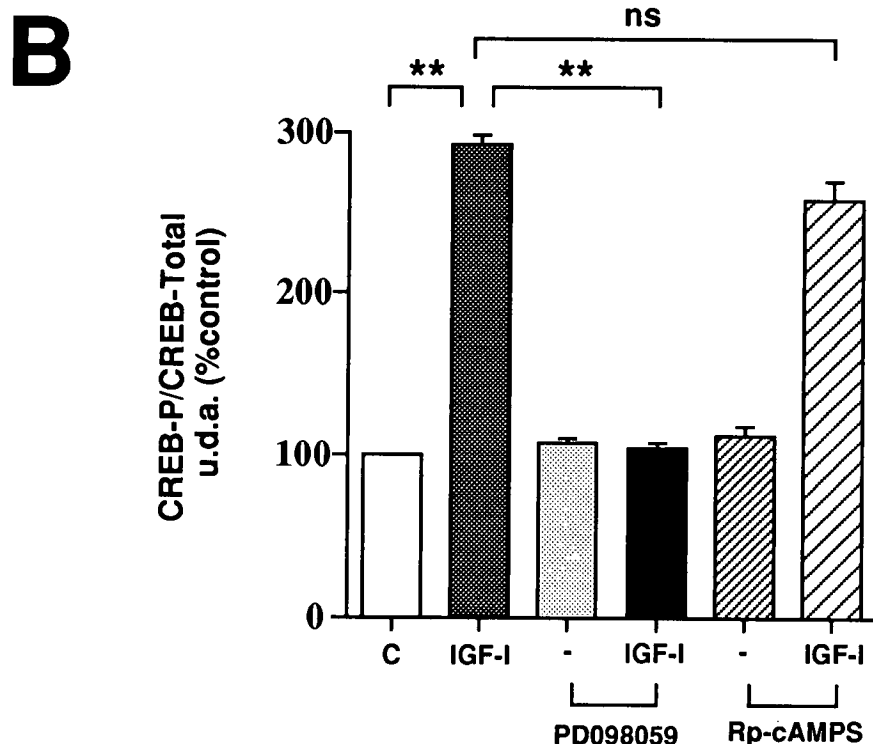
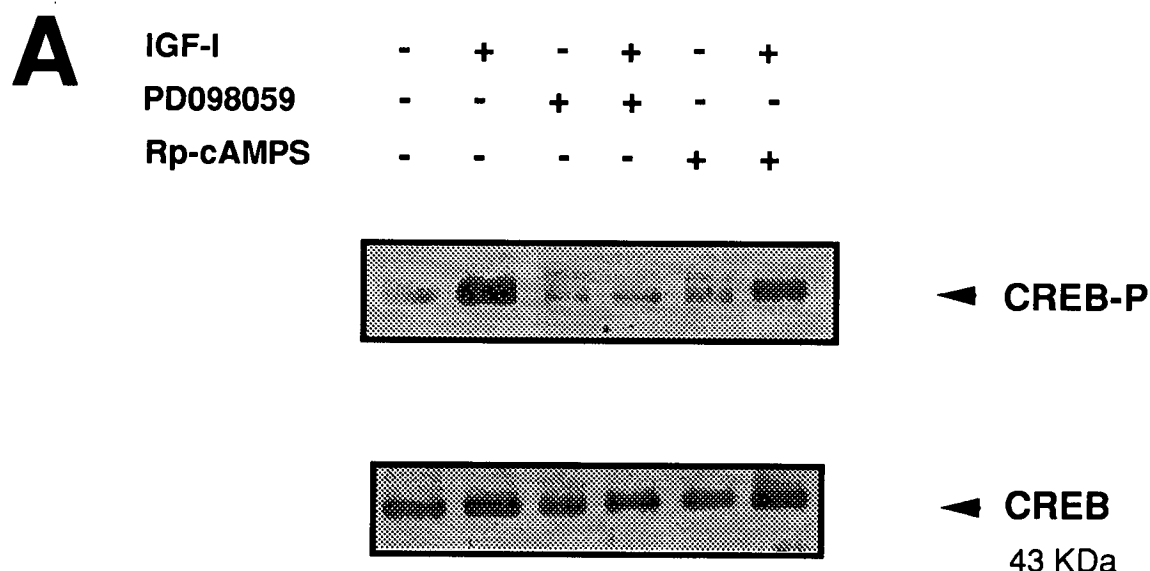
Para este estudio las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M], Rp-cAMPS [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). En la Figura 22B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa que el bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) abole completamente la activación de CREB inducida por IGF-I, y que el bloqueo de la PKA no parece afectar a dicha activación. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Es importante puntualizar que estos resultados se refieren a toda la población de células hipofisarias y que no son representativos de lo que ocurre en las células lactotropas. Son necesarios experimentos que demuestren si la

activación de CREB inducida por IGF-I requiere la activación de la PKA específicamente en las células lactotropas.

Por lo tanto, estos resultados indican que **IGF-I induce la activación de CREB en las células lactotropas a través de la vía Ras/MAPK.**



**Figura 22. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, y PKA sobre la activación de CREB inducido por IGF-I.** Las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con PD098059 [10  $\mu$ M] o Rp-cAMPS [10  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 10 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-CREB que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*, p<0,01, ns, no significativo.

## 7.2. Estudio del efecto de VIP sobre la activación de CREB

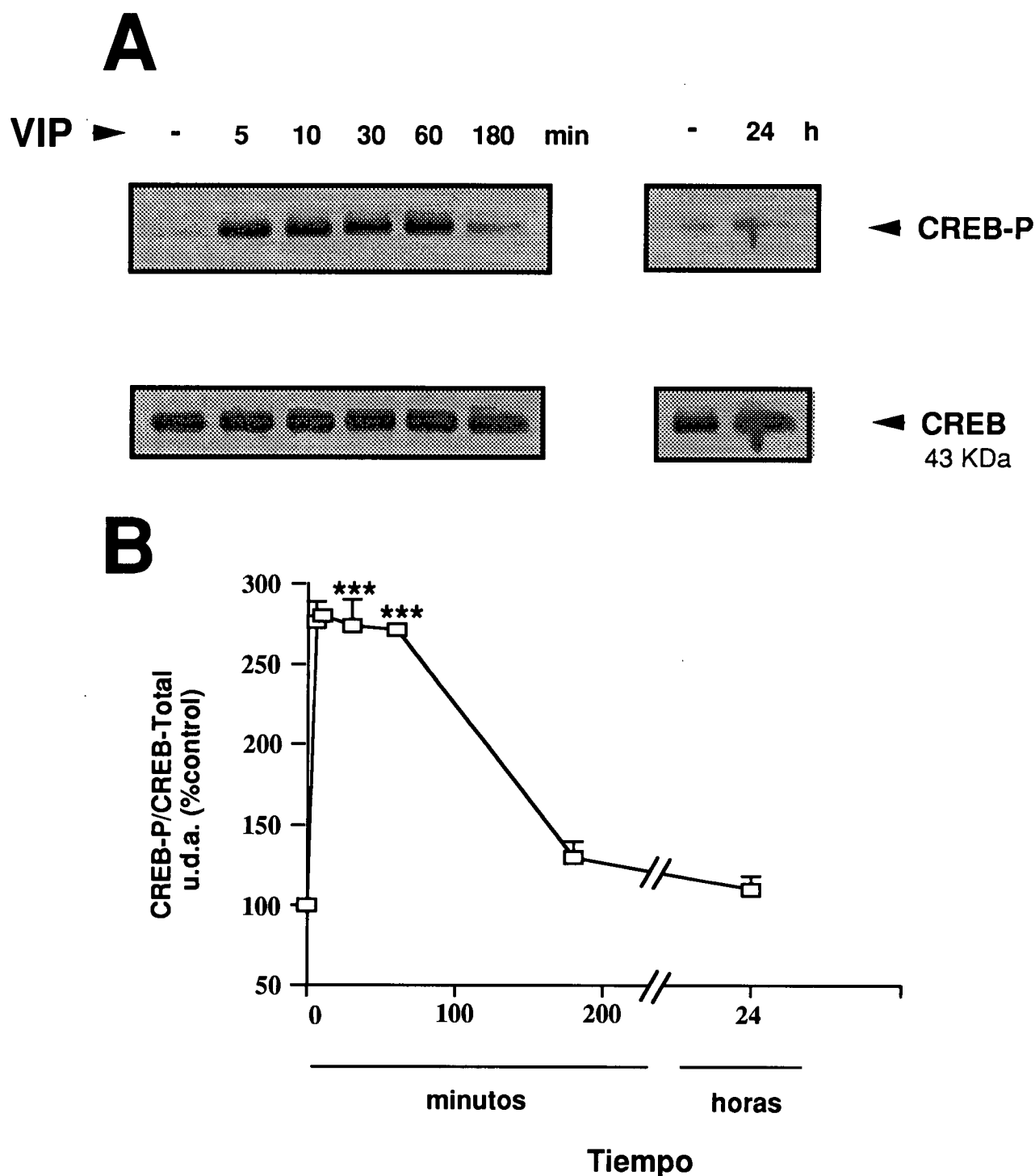
### 7.2.1. Efecto de VIP sobre la activación de CREB: estudio tiempo-respuesta

Está bien establecido que el AMPc regula la transcripción de numerosos genes a través de la traslocación de la subunidad catalítica de la PKA al núcleo y la consecuente fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) (Montminy, 1997).

Para comprobar la activación de CREB por VIP, las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60, 180 minutos y 24 horas. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma en que se explicó anteriormente y utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>).

En la Figura 23, en el panel A se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot de CREB (Ser<sup>133</sup>), en células hipofisarias incubadas y en presencia de VIP durante distintos tiempos. En la Figura 23B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una activación rápida de CREB por VIP que se mantiene en niveles muy elevados hasta los 60 minutos, momento en el que se produce el descenso. A las 24 horas de exposición al estímulo, no se observa activación de CREB.

Estos resultados confirman que **VIP activa CREB (Ser<sup>133</sup>) en células hipofisarias. Esta observación, junto con la cinética de activación de este factor transcripcional, indican su participación en la regulación de la transcripción génica inducida por VIP.**



**Figura 23. Estudio tiempo-respuesta del efecto de VIP sobre la activación de CREB.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron con VIP [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60, 180 minutos y 24 horas.

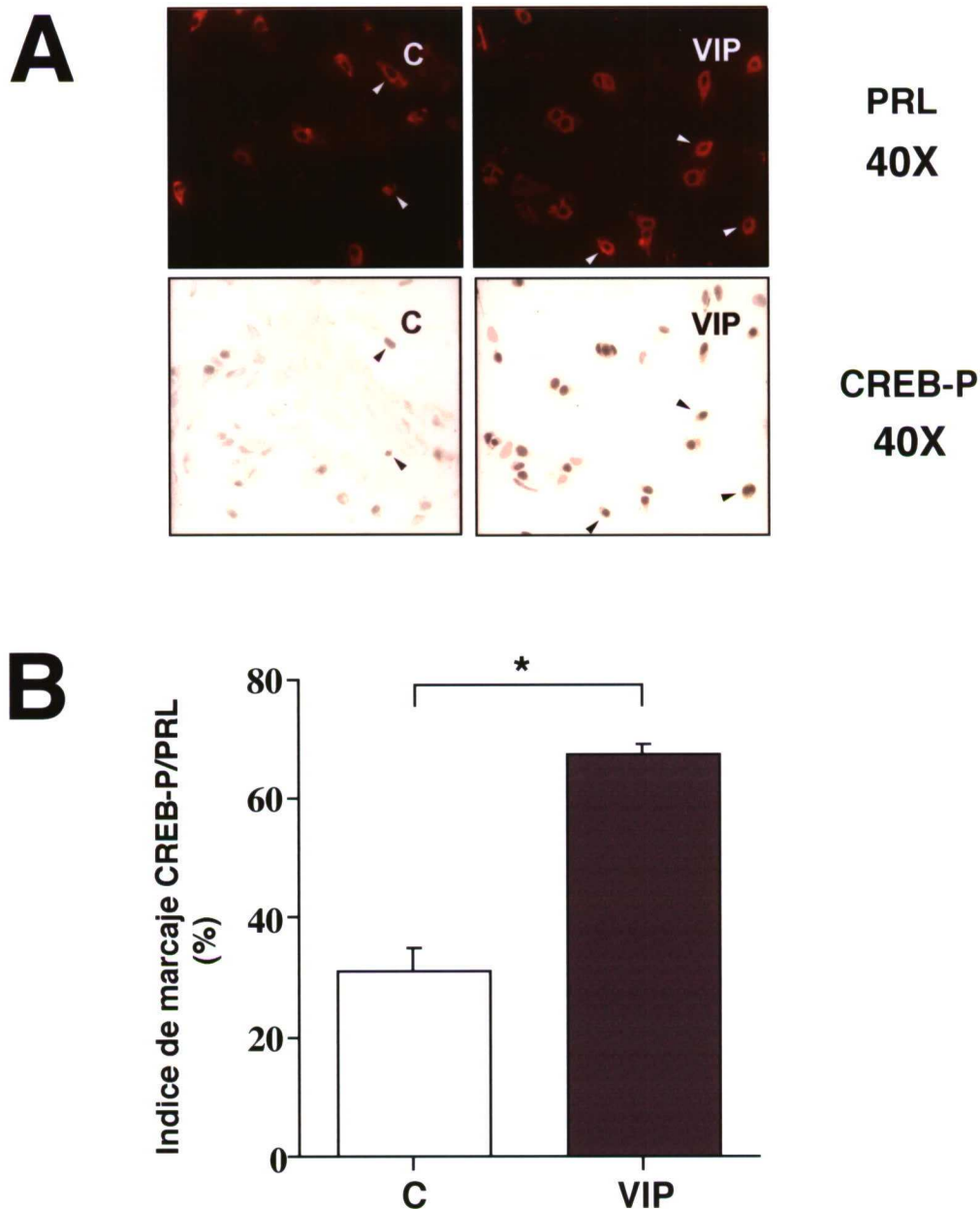
**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-CREB que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Para verificar si CREB era activado en las células lactotropas como consecuencia de la acción de VIP, se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos. Para ello, se emplearon placas multipocillo y las células se incubaron en presencia o no de VIP [ $10^{-7}$  M] durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió a la fijación del cultivo celular y las muestras se analizaron por métodos inmunocitoquímicos con doble marcaje, para reconocer las formas fosforiladas de CREB y las células lactotropas. La detección de CREB-P se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con biotina marcando los núcleos en marrón, y para las células lactotropas un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, apareciendo los citoplasmas en rojo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24, donde el panel A muestra imágenes representativas del estudio. En las células hipofisarias tratadas con VIP [ $10^{-7}$  M] se observa un claro aumento en el número de células lactotropas en las cuales CREB es activado (indicado por las cabezas de flecha), con respecto a los controles no tratados. En el panel B se representa el porcentaje de células inmunoreactivas para ambos CREB-P y PRL del total de células lactotropas contadas, observándose que VIP incrementa el índice de marcaje CREB-P/PRL.

Estos datos demuestran que **VIP induce la activación de CREB en las células lactotropas, lo cual sugiere que CREB participa en la acción mitogénica de VIP.**



**Figura 24. Efecto de VIP sobre la activación del factor transcripcional CREB en las células lactotropas.** Las células hipofisarias se mantuvieron en medio sin suero durante 24 horas. Posteriormente, se incubaron en presencia de VIP [ $10^{-7}$ M] durante 10 minutos.

**A:** El panel muestra una doble inmunocitoquímica de células hipofisarias en presencia o no de VIP [ $10^{-7}$ M] durante 10 minutos. Se utilizó un anticuerpo anti-CREB-P para la detección de las formas fosforiladas (núcleo marcado en color marrón) y un anticuerpo anti-PRL para identificar a las células lactotropas (citoplasma teñido en rojo). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos para CREB correspondientes a las células lactotropas que están señaladas en el panel superior.

**B:** La figura representa el porcentaje de células hipofisarias inmunoreactivas para ambos CREB y PRL de todas las células PRL-inmunoreactivas contadas. Los valores representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=2$ ), \*,  $p<0,05$ .



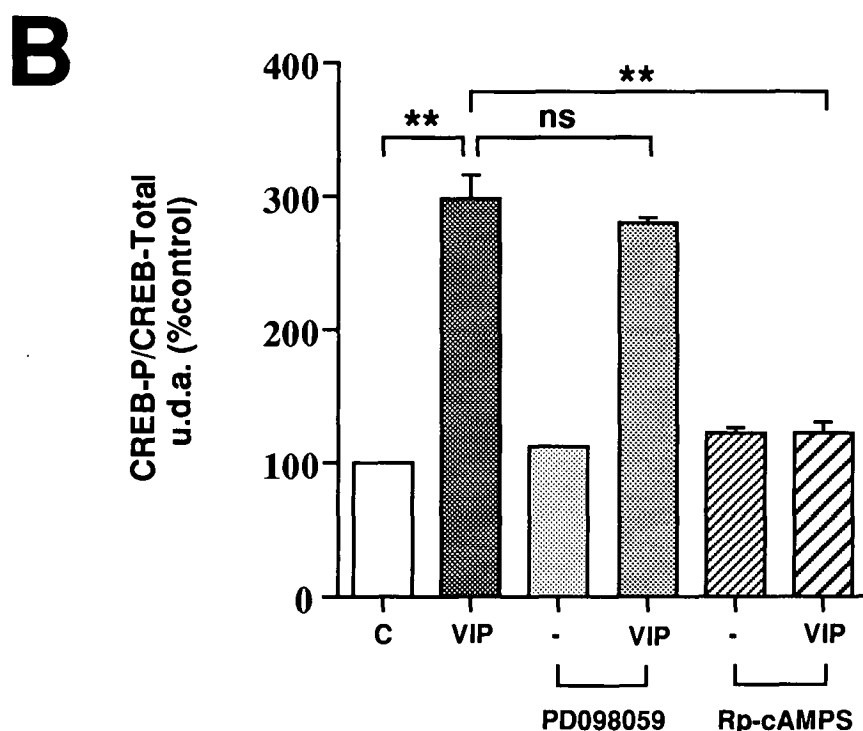
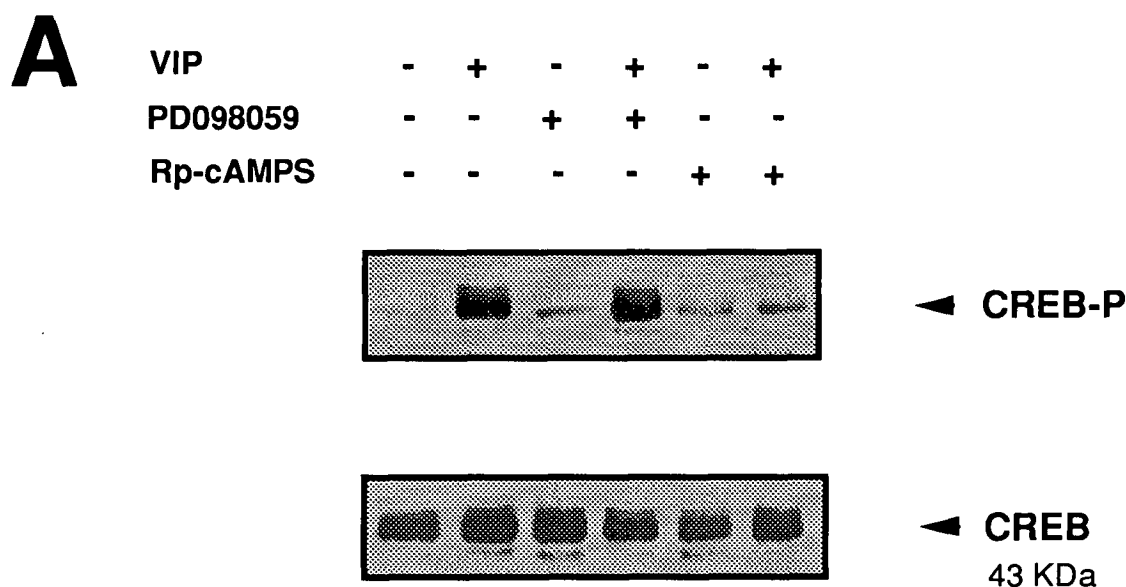
### 7.2.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la activación de CREB inducida por VIP

En los resultados previos hemos demostrado que VIP activa CREB (Ser<sup>133</sup>) en las células hipofisarias y en particular en las células lactotropas. Además, VIP necesita la activación de MAPK para promover su acción mitogénica. Estudios previos y nuestros datos indican que VIP induce la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) a través de AMPc/PKA (Le Péchon-Vallée, 2000).

Por todo ello, nos planteamos comprobar si existía interdependencia entre las vías de señalización MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA, en la activación de CREB inducida por VIP. Para este estudio las células hipofisarias se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 [10  $\mu$ M], Rp-cAMPS [10  $\mu$ M]. Posteriormente, se añadió VIP [ $10^{-7}$  M] durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). En la Figura 25B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa que el bloqueo de la PKA abole completamente la activación de CREB inducida por VIP, y que el bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) no afectó a dicha activación. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Por lo tanto, estos resultados indican que **la vía AMPc/PKA cuando es activada por VIP, fosforila y activa CREB (Ser<sup>133</sup>) directamente sin requerir la activación de la vía MAPK.**



**Figura 25. Efecto del bloqueo de las vías MAPK, y PKA sobre la activación de CREB inducido por VIP.** Las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con PD098059 [10  $\mu$ M] o Rp-cAMPS [10  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 10 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de CREB (Ser<sup>133</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-CREB que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de CREB, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*, p<0,01, ns, no significativo.

## 8. ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA SRE Y CRE

Las señales extracelulares conducen a la activación de una serie de moléculas de señalización intracelular, entre las que se encuentran las proteínas quinasas. Muchas de estas rutas de transducción de señales convergen en la activación de factores de transcripción, los cuales, una vez activados, se unen a sus elementos de respuesta presentes en el promotor de los genes modulando la transcripción de los mismos.

Nuestros resultados previos muestran que IGF-I y VIP requieren la participación de la vía MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA para inducir su acción mitogénica. Además, ambos factores tróficos promueven la activación del factor transcripcional CREB, el cual es crítico y necesario para la transcripción génica. Por todo ello, nos propusimos estudiar si la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE (elemento de respuesta al suero) y CRE (elemento de respuesta a AMPc), podría ser activada transcripcionalmente por IGF-I y VIP. Además, nuestros resultados demuestran que CREB es activado en las células lactotropas, lo cual sugiere que participa en la acción mitogénica de estos factores de crecimiento. Por lo tanto, nos planteamos analizar si existía interrelación entre las vías de señalización de IGF-I y VIP en la regulación de la expresión de genes regulados por el CRE.

Para realizar estos estudios, las células GH4C1 (línea celular productora de PRL) se transfectaron con genes informadores-*cis* (*reporter genes*) que contienen el gen luciferasa bajo el control de un elemento promotor básico (caja TATA) unido a los elementos de respuesta a estudiar, tal y como se describe en material y métodos (apartado VI). Los elementos de respuesta objeto de estudio fueron el SRE, al que se unen factores de transcripción activados por las MAPK/ERKs y el CRE al que se une CREB tras su activación por PKA o por MAPK/ERKs.

## **8.1. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión basal del gen de luciferasa (pGL3-Control)**

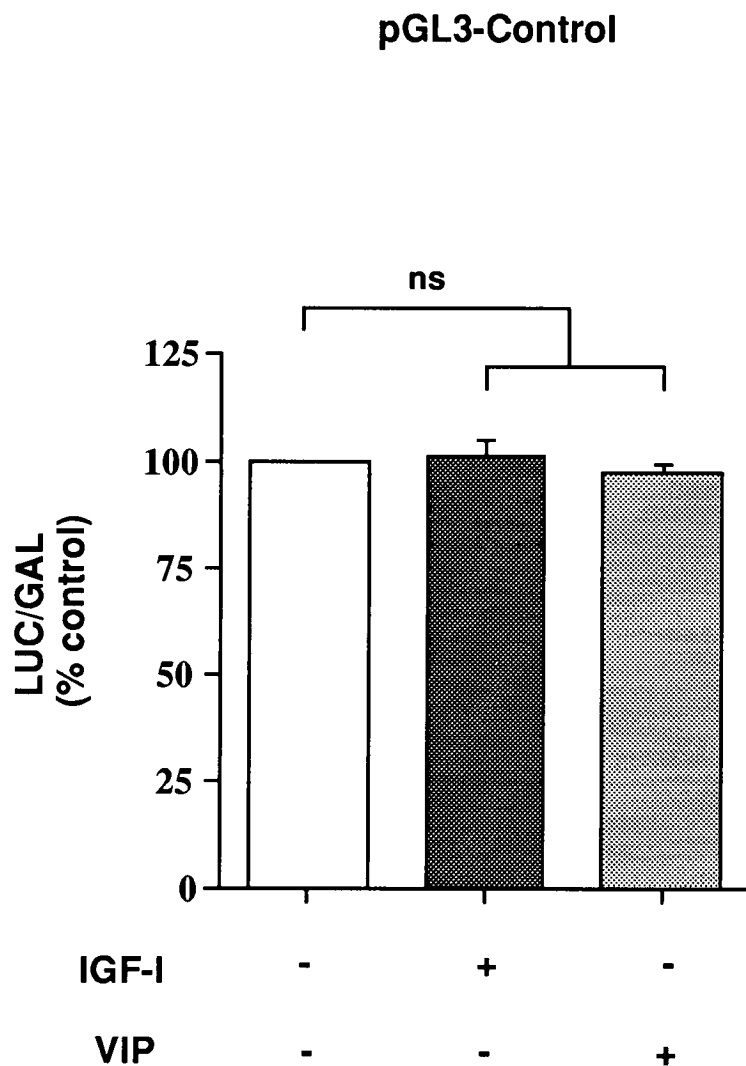
En primer lugar realizamos una serie de controles que nos permitieran garantizar la fiabilidad de los resultados que obtuviéramos en el experimento. Los experimentos control tuvieron como objeto demostrar que la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal sólo, es decir, sin ningún elemento de respuesta unido a él, no se veía alterada por IGF-I o VIP.

Para ello, las células GH4C1 se transfectaron con el vector pGL3-Control y se incubaron durante 24 horas en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M]. Como se observa en la Figura 26, la actividad basal del gen de luciferasa no se modificó con ninguno de los tratamientos cuando se comparó con el grupo control.

## **8.2. Efecto del FCS sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal unido a los diferentes elementos de respuesta**

El siguiente grupo de experimentos control tuvieron como objeto demostrar que los diferentes elementos de respuesta respondían de una manera adecuada a la presencia de agentes externos en el medio de incubación. Para realizar estos experimentos, las células GH4C1 se transfectaron con los diferentes vectores de expresión objeto de estudio, pGL3-Control, pGL3-SRE o pGL3-CRE, tras lo cual, se incubaron en presencia de medio de cultivo suplementado con 10% de FCS durante 24 horas. Tal y como se puede observar en las Figuras 27A y 28A, el suero aumentó la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal unido a los elementos de respuesta SRE y CRE cuando se comparó con el grupo control.

Estos resultados demuestran que los diferentes elementos de respuesta utilizados responden de una forma adecuada a la presencia de agentes externos, en este caso, al suero.



**Figura 26. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión basal del gen de luciferasa en células GH4C1.** Las células GH4C1, previamente incubadas durante 24 horas en medio de cultivo, se transfectaron con el vector pGL3-Control. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M] durante 24 horas. Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/ actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto al grupo control. Los valores representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. (n=2), ns, no significativo.

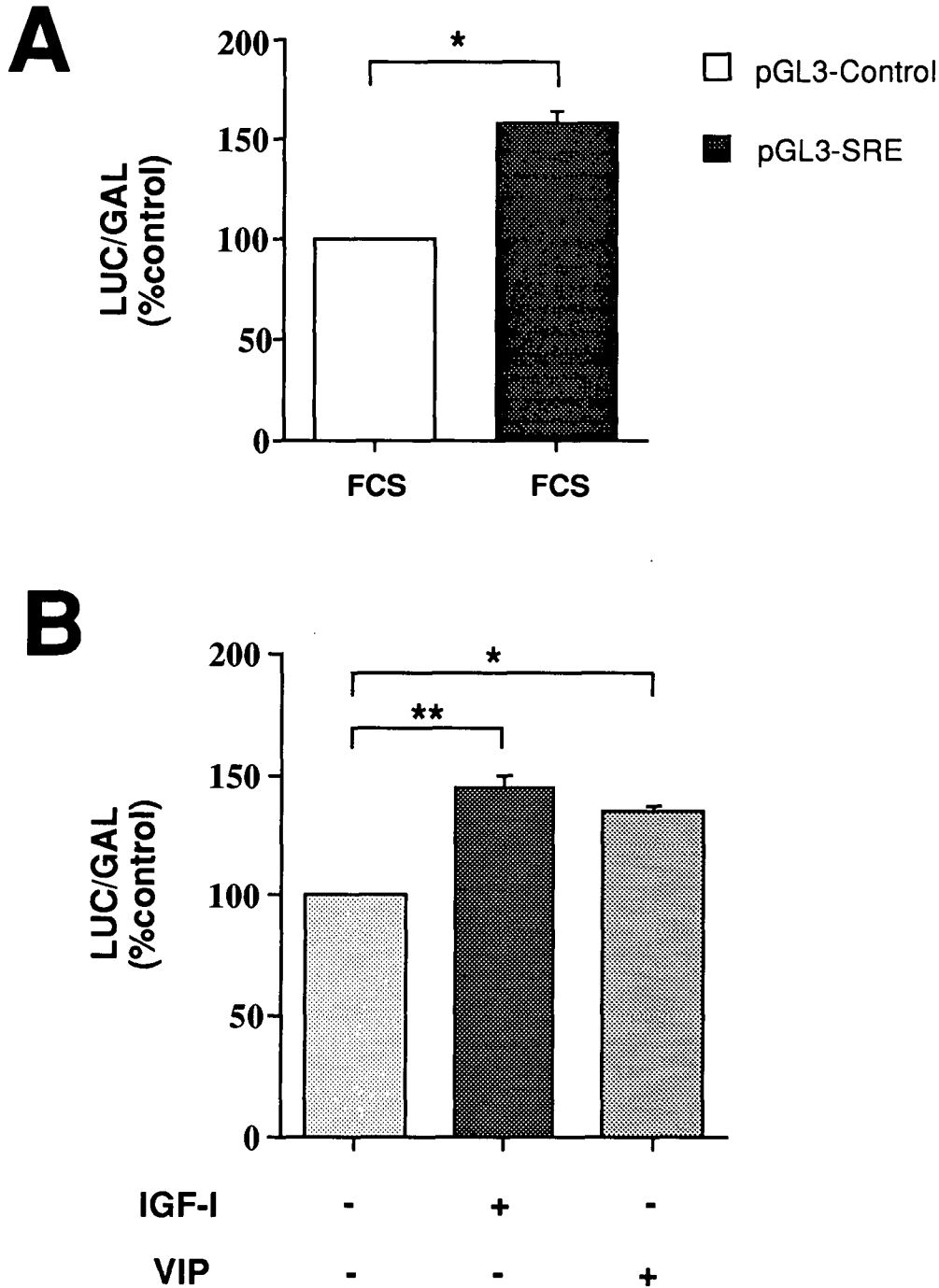
### 8.3. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el promotor basal unido a los diferentes elementos de respuesta

Una vez comprobado que el diseño experimental, en condiciones control, respondía de forma adecuada, realizamos los estudios experimentales. Para ello, las células GH4C1 se transfectaron con los vectores de expresión pGL3-SRE o pGL3-CRE y se incubaron durante 24 horas en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M]. Al final de cada experimento, la actividad luciferasa y la actividad  $\beta$ -galactosidasa se midieron según se describe en apartado VI de material y métodos.

En la Figura 27B se muestra el efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa bajo el control del promotor basal unido al elemento de respuesta SRE. Como se puede observar, IGF-I y VIP produjeron un aumento significativo en la expresión del gen de luciferasa, asociado con una mayor actividad enzimática.

Similares resultados se obtuvieron cuando se estudió el efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa bajo el control del promotor basal unido al elemento de respuesta CRE (Figura 28B).

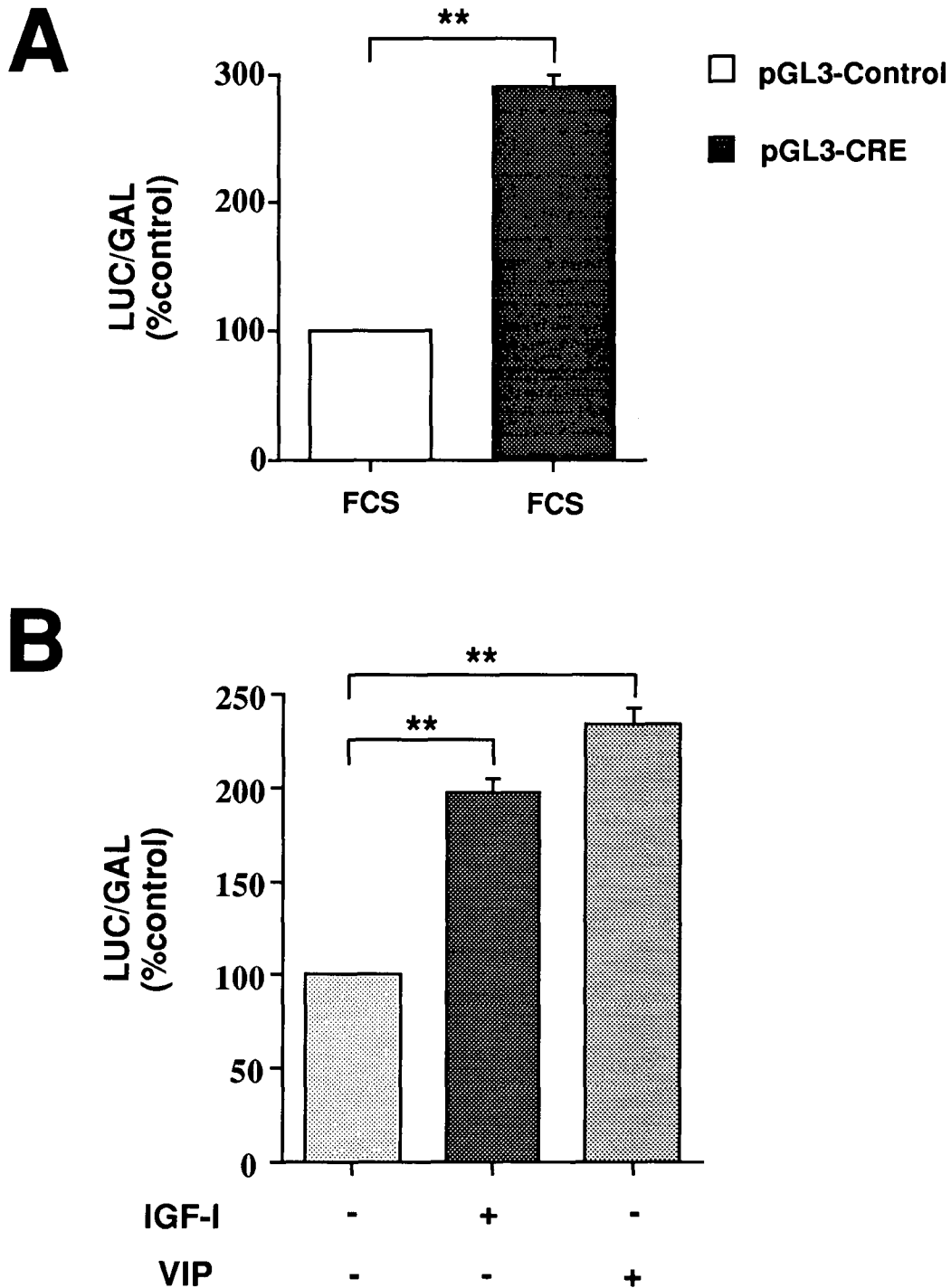
Estos resultados ponen de manifiesto que **tanto IGF-I como VIP son capaces de aumentar la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE. Por lo tanto, apoyan los resultados obtenidos anteriormente y sugieren que IGF-I y VIP podrían inducir proliferación celular en las células lactotropas, por su capacidad de actuar estimulando genes relacionados con proliferación.**



**Figura 27. Efecto del FCS, IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el SRE en las células GH4C1.** Las células GH4C1, previamente incubadas durante 24 horas en medio de cultivo, se transfectaron con el vector pGL3-Control y pGL3-SRE. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de FCS 10%, IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M] durante 24 horas.

**A:** FCS 10% **B:** IGF-I y VIP.

Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/ actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*, p<0,05, \*\*, p<0,01.



**Figura 28. Efecto de IGF-I y VIP sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE en las células GH4C1.** Las células GH4C1, previamente incubadas durante 24 horas en medio de cultivo, se transfectaron con el vector pGL3-Control y pGL3-CRE. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de FCS 10%, IGF-I [ $10^{-7}$  M] y VIP [ $10^{-7}$  M] durante 24 horas.

**A:** FCS 10%. **B:** IGF-I y VIP.

Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/ actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*, p<0,01.



#### **8.4. Efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el elemento de respuesta CRE e inducida por IGF-I y VIP**

Estudios previos han demostrado que el factor transcripcional CREB se une como un dímero al CRE (elemento de respuesta a AMPc) que se encuentra en el promotor de numerosos genes (Montminy, 1997).

Hemos visto que tanto IGF-I como VIP fosforilan y activan CREB (Ser<sup>133</sup>) lo cual es crítico y necesario, pero no suficiente para la inducción de genes de expresión temprana. CREB es sólo un componente de un complejo de factores activadores que se unen al promotor. Trabajos previos indican que procesos como el reclutamiento y la regulación de coactivadores que se asocian a CREB, así como la interacción con otros factores de transcripción, regulan la capacidad de CREB para inducir la expresión génica (Shaywitz y Greenberg, 1999). Se ha identificado una proteína nuclear CBP (proteína de unión a CREB) que se une específicamente a CREB fosforilado (Chrivia, 1993). Existen datos que muestran que la actividad del coactivador puede ser regulado por una variedad de quinasas, incluyendo PKA y ERK 1/2 (Kwok, 1994; Liu, 1998). Estudios recientes indican que la vía AMPc/PKA requiere la vía MAPK (ERK 1/2) para activar CBP y componentes necesarios para inducir la expresión de genes regulados por el CRE (Grewal, 2000b).

Por tanto, es probable que las interacciones de diferentes señales contribuyan a la expresión génica mediada por CREB. Nos planteamos comprobar si a nivel transcripcional, existía interdependencia entre las vías de señalización MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA en la regulación de la expresión génica controlada por el elemento CRE.

Para ello, las células GH4C1 se transfectaron con el vector pGL3-CRE. Posteriormente, las células se preincubaron durante 45 minutos en presencia del inhibidor PD098059 a una concentración final de [50  $\mu$ M] que bloquea la vía MAPK o con Rp-cAMPS a una concentración final de [10  $\mu$ M] que bloquea la PKA. A continuación, las células se expusieron a IGF-I [10<sup>-7</sup> M] o VIP [10<sup>-7</sup> M]

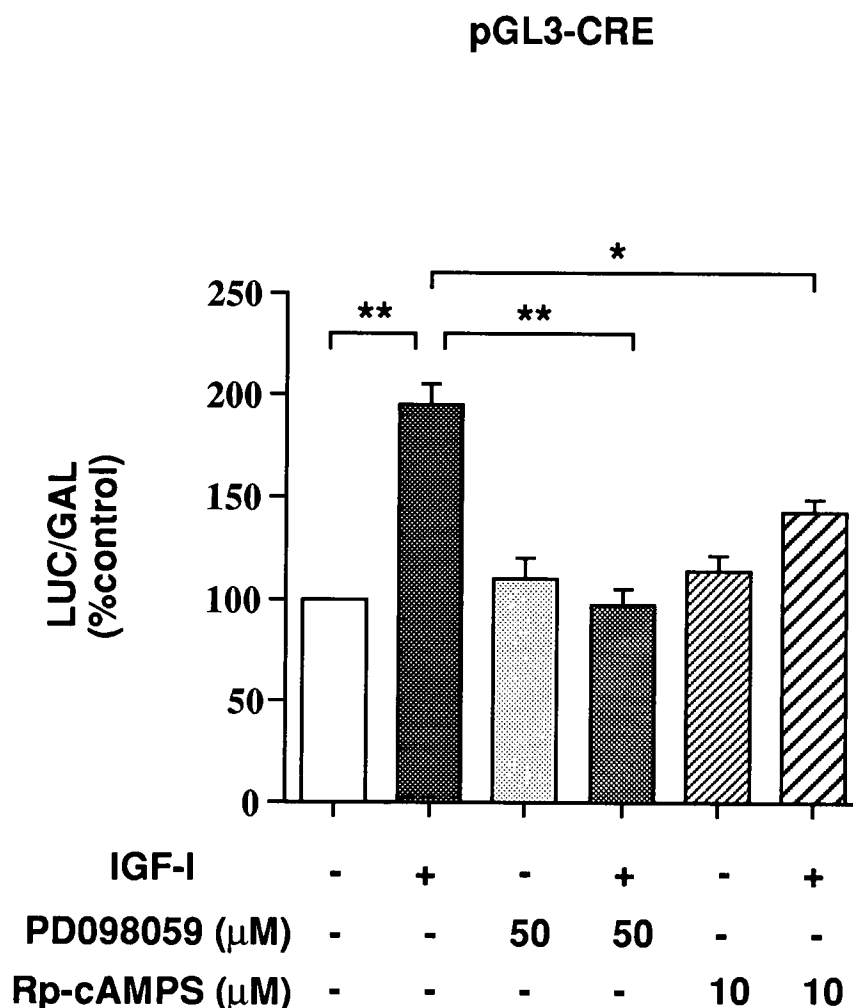
durante 24 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Para este tipo celular, la concentración utilizada de [50  $\mu$ M] es más efectiva que la de [10  $\mu$ M] para este efecto. Hay que destacar que esta parte del estudio se ha realizado en una línea celular hipofisaria y los estudios anteriores en cultivos primarios, por lo que se pueden requerir diferentes concentraciones del inhibidor.

Los resultados se representan en la Figura 29 donde se muestra el efecto del bloqueo de las vías MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE e inducida por IGF-I. Se confirma que IGF-I aumenta la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE. Además, se observa que la presencia del inhibidor de la vía MAPK/ERKs, abole totalmente la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE cuando se compara con el grupo tratado con IGF-I. La presencia del inhibidor de la PKA reduce parcialmente la acción de IGF-I sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

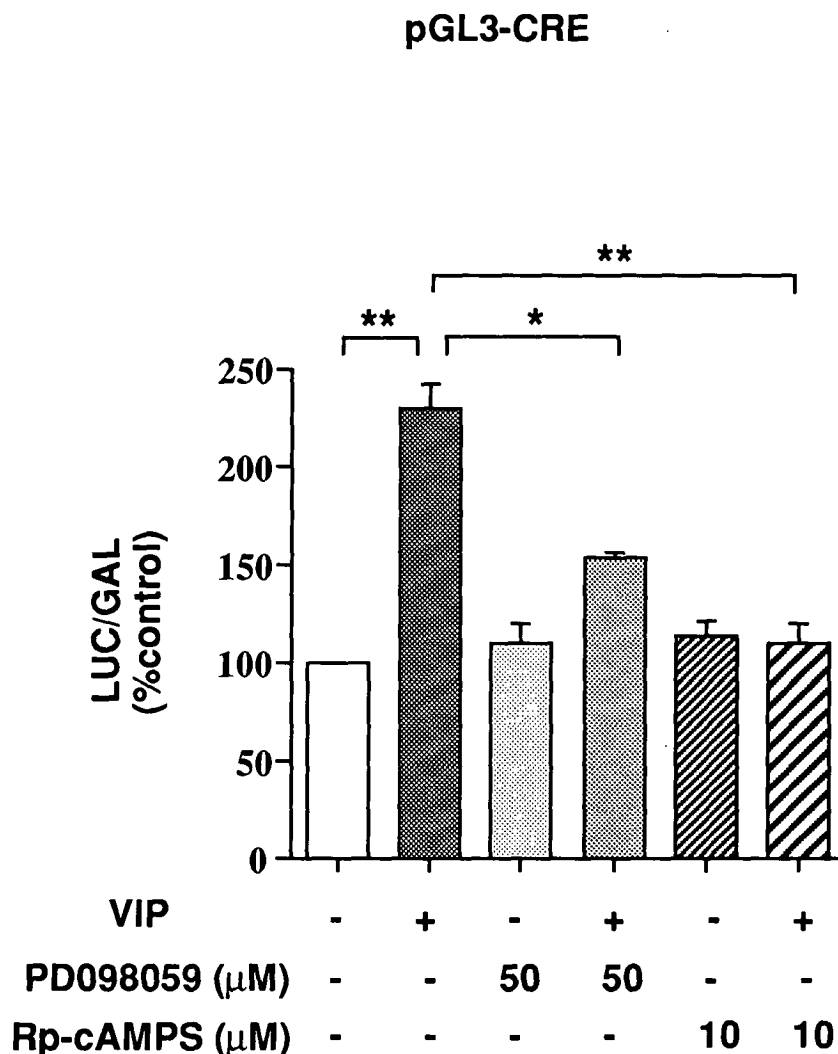
**Estos datos sugieren que la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) y la PKA son necesarias para la regulación de la expresión de genes regulados por el elemento CRE e inducida por IGF-I.**

La Figura 30 muestra el efecto del bloqueo de la vía MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE e inducida por VIP. Se confirma que VIP aumenta la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE. Además, se observa que la presencia del inhibidor de la PKA, reduce totalmente la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE cuando se compara con el grupo tratado con VIP. La presencia del inhibidor de la vía MAPK/ERKs reduce parcialmente la acción de VIP sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE. La presencia de los inhibidores no produce ningún efecto comparado con el control sin inhibidor.

Estos resultados indican que **VIP necesita la activación de la PKA para la regulación de la expresión génica mediada por CREB; además, la vía de señalización MAPK (ERK 1/2) tiene un papel importante en la activación transcripcional que VIP ejerce sobre genes regulados por el CRE.**



**Figura 29. Efecto del bloqueo de la vía MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE e inducido por IGF-I, en las células GH4C1.** Las células GH4C1, previamente incubadas durante 24 horas en medio de cultivo, se transfectaron con el vector pGL3-CRE. Posteriormente, las células fueron preincubadas durante 45 minutos en presencia del inhibidor PD098059 a una concentración final de [50 μM] y de Rp-cAMPS a una concentración final de [10 μM]. A continuación, las células se mantuvieron en presencia de IGF-I [10<sup>-7</sup> M] durante 24 horas. Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/ actividad β-galactosidasa con respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos ± E.S. (n=3), \*, p<0,05, \*\*, p<0,01.



**Figura 30. Efecto del bloqueo de la vía MAPK y PKA sobre la expresión del gen de luciferasa controlado por el CRE e inducido por VIP en las células GH4C1.** Las células GH4C1, previamente incubadas durante 24 horas en medio de cultivo, se transfectaron con el vector pGL3-CRE. Posteriormente, las células fueron preincubadas durante 45 minutos en presencia del inhibidor PD098059 a una concentración final de [50  $\mu\text{M}$ ] y de Rp-cAMPS a una concentración final de [10  $\mu\text{M}$ ]. A continuación, las células se mantuvieron en presencia de VIP [10<sup>-7</sup> M] durante 24 horas. Los resultados representan el porcentaje de la actividad luciferasa/ actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*, p<0,05, \*\*, p<0,01.

## 9. ESTUDIO DE LA ACCIÓN ANTI-APOPTÓTICA DE IGF-I

En estudios previos se ha descrito que IGF-I inhibe la apoptosis promoviendo el incremento en la expresión de Bcl-xL (Párrizas, 1997a) y que ésta acción se realiza mediante la activación de las vías de señalización MAPK y PI3'-Kinasa (Párrizas, 1997b). Otros trabajos han indicado que la activación de Akt, a través de la vía PI3'-Kinasa, juega un papel muy importante en la supervivencia celular (Marte, 1997). Recientemente se ha demostrado que IGF-I regula la expresión de Bcl-2, vía Akt/PKB en células PC12 (Pugazhenthí, 2000). En este estudio, hemos demostrado que IGF-I promueve la activación de Akt en las células hipofisarias.

Por todo ello, los siguientes experimentos se realizaron con el fin de clarificar si IGF-I puede tener acciones de supervivencia sobre las células hipofisarias por la inducción de la proteína Bcl-2 y la fosforilación e inhibición de Bad. Así mismo, nos planteamos analizar el mecanismo mediante el cual IGF-I ejercería esta acción.

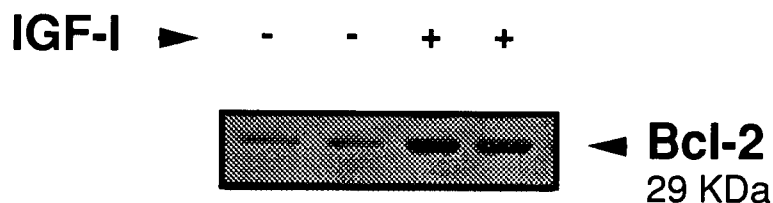
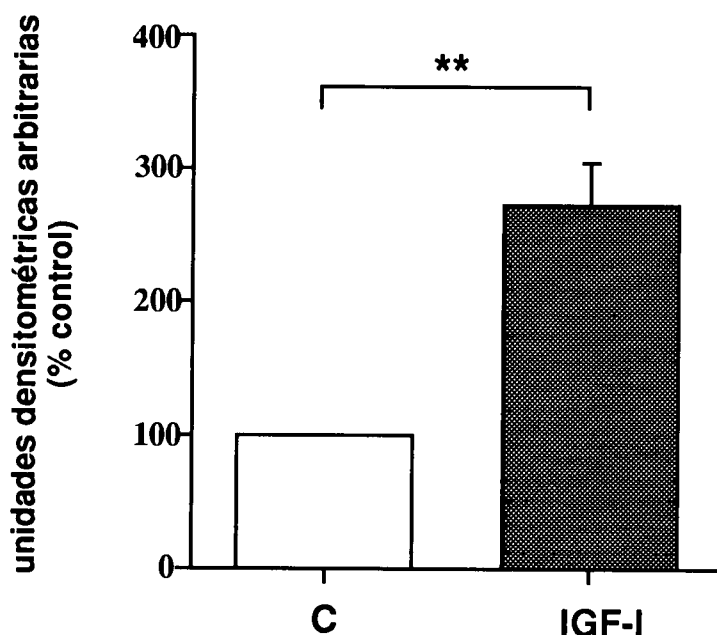
### 9.1. Efecto de IGF-I sobre los niveles de Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 ha sido implicada en supervivencia celular. Bcl-2 y Bcl-xL suprimen la apoptosis en parte por el bloqueo de la liberación del citocromo C de la mitocondria, un paso crítico en la activación de la cascada de las caspasas (Franke, 1997). Estudios previos han mostrado que la regulación de la expresión de Bcl-2 es un mecanismo crítico por el cual los factores de crecimiento promueven la supervivencia celular (Tamatani, 1998; Pugazhenthí, 1999b).

Para estudiar el efecto de IGF-I sobre los niveles de Bcl-2, las células hipofisarias se incubaron en presencia o no de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante 48 horas. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma que se describió anteriormente y utilizando un anticuerpo específico de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

En la Figura 31A se muestra una autorradiografía correspondiente a un Western blot de Bcl-2, de células hipofisarias incubadas en presencia o no de IGF-I. En la Figura 31B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa un aumento significativo de la concentración de Bcl-2 en las células tratadas con IGF-I.

Estos resultados sugieren que **IGF-I puede tener una acción anti-apoptótica en las células hipofisarias, a través de la inducción de Bcl-2.**

**A****B**

**Figura 31. Efecto del tratamiento con IGF-I sobre los niveles de la proteína Bcl-2 en cultivos de las células hipofisarias de rata.** Tras el periodo de preincubación, las células fueron incubadas con IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 48 horas. La acción anti-apoptótica fue analizada midiendo Bcl-2 por Western blot.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot de la proteína Bcl-2.

**B:** La figura representa los valores densitométricos, en porcentaje respecto al grupo control. Los valores representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. ( $n=2$ ), \*\*,  $p<0,01$ .



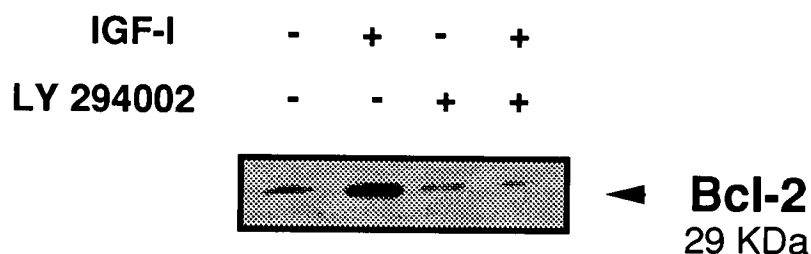
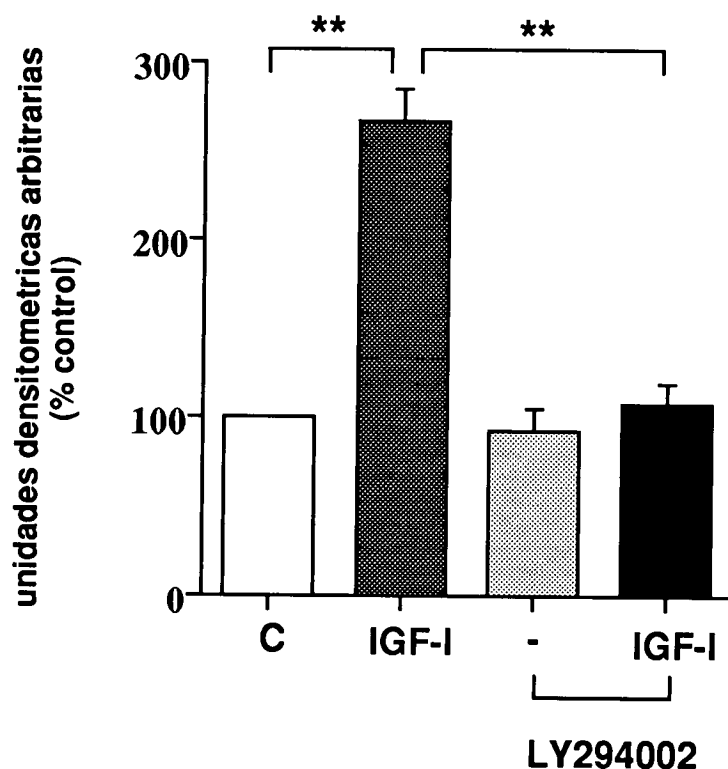
## 9.2. Efecto del bloqueo de la vía PI3'-Kinasa sobre los niveles de Bcl-2

Estudios recientes han mostrado que IGF-I regula la expresión de Bcl-2, vía Akt/PKB en células PC12 (Pugazhenth, 2000).

Con el fin de clarificar el mecanismo mediante el cual IGF-I induce la proteína Bcl-2, las células hipofisarias se preincubaron durante 45 minutos con el inhibidor de la vía PI3'-Kinasa, LY294002 a una dosis final de [20  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con IGF-I durante 48 horas. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32, donde el panel A muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo específico de la proteína Bcl-2. En la Figura 32B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa que el inhibidor de la PI3'-Kinasa bloquea completamente la inducción de la proteína Bcl-2 por IGF-I.

Estos resultados indican que **IGF-I, a través de la vía PI3'-Kinasa, regula la expresión de Bcl-2 y la supervivencia en las células hipofisarias.**

**A****B**

**Figura 32. Efecto del bloqueo de la vía PI3'-Kinasa sobre los niveles de la proteína Bcl-2 inducidos por IGF-I en cultivos de células hipofisarias de rata.** Las células se preincubaron durante 45 minutos con LY294002 [20  $\mu$ M] y posteriormente se trataron con IGF-I [ $10^{-7}$ M] durante 48 horas. La acción antiapoptótica fue analizada midiendo Bcl-2 por Western blot.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot de la proteína Bcl-2.

**B:** La figura representa los valores densitométricos, en porcentaje respecto al grupo control. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  E.S. (n=3), \*\*,p<0,01.

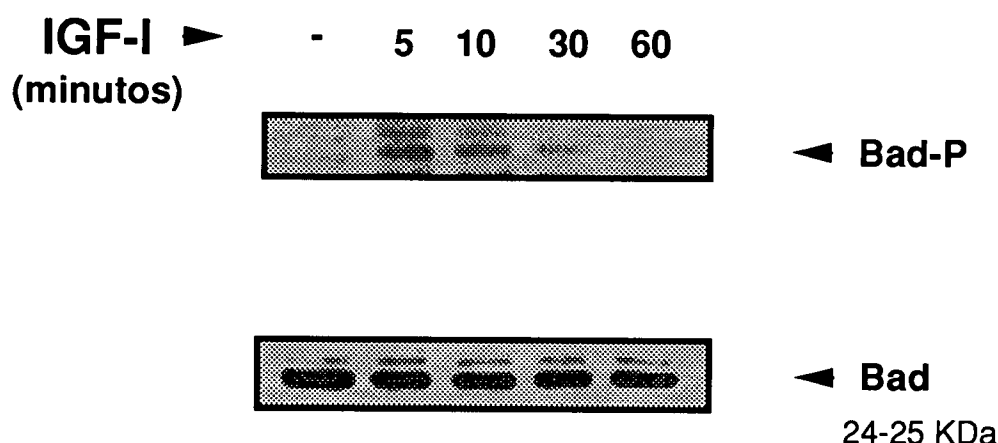
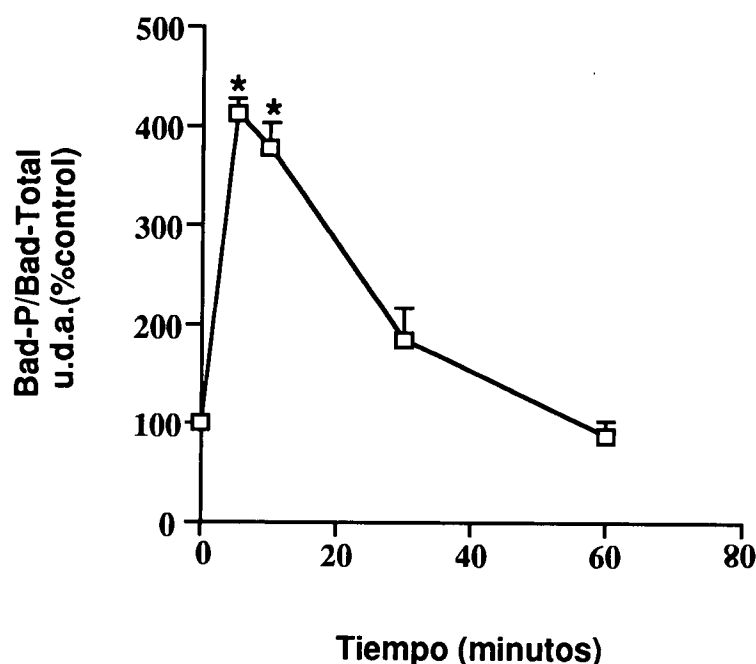
### 9.3. Acción de IGF-I sobre la activación de Bad: estudio tiempo-respuesta

Estudios previos han demostrado que uno de los mecanismos por los cuales los factores de crecimiento suprimen la apoptosis y promueven la supervivencia celular, es mediante la fosforilación e inhibición del miembro de la familia Bcl-2, Bad a través de la vía PI3'-Kinasa (Datta, 1997; 1999). Concretamente IGF-I, a través de Akt bloquea la muerte celular mediada por Bad, por su fosforilación en la serina 136 (Ser<sup>136</sup>).

Para estudiar el efecto de IGF-I sobre la fosforilación e inhibición de Bad (Ser<sup>136</sup>), las células hipofisarias se incubaron en presencia de IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30 y 60 minutos. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas por Western blot se llevó a cabo de la forma en que se explicó en material y métodos (apartado IV), utilizando un anticuerpo específico que reconoce las formas fosforiladas de Bad (Ser<sup>136</sup>).

En la Figura 33A se muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot de Bad (Ser<sup>136</sup>), en células hipofisarias incubadas en presencia de IGF-I durante distintos tiempos. En la Figura 33B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa una fosforilación rápida de Bad por IGF-I, con un pico máximo a los 5 minutos, que regresa a los niveles basales a los 30 minutos.

Estos datos confirman que **IGF-I fosforila e inhibe Bad (Ser<sup>136</sup>) en las células hipofisarias, probablemente a través de la vía PI3'-Kinasa, suprimiendo de esta forma la apoptosis e induciendo supervivencia celular.**

**A****B**

**Figura 33. Estudio tiempo-respuesta del efecto de IGF-I sobre la fosforilación de Bad en células hipofisarias.** Las células fueron incubadas con IGF-I [ $10^{-7}$  M] durante los siguientes tiempos: 5, 10, 30, 60 minutos.

**A:** Autorradiografía representativa de un Western blot, donde se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas de Bad (Ser<sup>136</sup>). Debajo se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo anti-Bad que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de esta quinasa.

**B:** Cuantificación densitométrica de Bad, corregida por el control de carga y en porcentaje respecto al grupo control. Los datos representan la media de dos experimentos  $\pm$  E.S. (n=2), \*, p<0,05.

# DISCUSIÓN

La acción de IGF-I sobre proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares y en distintas etapas del desarrollo (Jones, 1995; LeRoith, 1995) está bien establecida. Sin embargo, el papel que el IGF-I pueda tener en la proliferación y la diferenciación de las células hipofisarias en la rata, está aun sin definir.

VIP es un neuropéptido con una extensa distribución en el SNC y SNP donde ejerce un amplio espectro de acciones biológicas. VIP presenta propiedades mitogénicas en el SNC durante el desarrollo embrionario (Gressens, 1993). Numerosos estudios han demostrado el importante papel que VIP desempeña en la regulación de PRL. El estudio de la acción de VIP en la hipófisis ha sido una línea de investigación desarrollada durante los últimos años en nuestro laboratorio (Lara, 1991; Balsa, 1994). En estos trabajos se demostró que IGF-I inducía la expresión de VIP en adenohipófisis, y que VIP hipofisario tenía una importante acción autocrina y paracrina en el control de la regulación de PRL. Estos estudios sugerían que IGF-I y VIP pudieran interaccionar en la adenohipófisis en el control de la regulación de PRL.

**En el presente trabajo se ha estudiado por primera vez la acción proliferativa de IGF-I y VIP en las células adenohipofisarias en cultivo primario. También se ha analizado la interacción de estos factores y las vías de señalización que median sus acciones sobre la proliferación de las células hipofisarias, y en particular de las células lactotropas. Por último, se ha estudiado la acción anti-apoptótica de IGF-I sobre las células de la adenohipófisis y los mecanismos moleculares que median dicha acción.**

Nuestros estudios se han realizado utilizando cultivos primarios de células de hipófisis de rata. Numerosos trabajos acreditan al cultivo primario mixto de células hipofisarias de rata como el modelo experimental *in vitro* más apropiado para el estudio simplificado de la función de un tejido tan complejo como la glándula hipofisaria. Este modelo experimental se caracteriza por la versatilidad de sus aplicaciones. En este sentido, los cultivos primarios ofrecen

una serie de ventajas como son una mayor homogeneidad de los grupos experimentales, son sistemas estables, duraderos y reproducibles. Así mismo permiten la evaluación de los procesos de síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias, y el estudio de los mecanismos de acción de las señales reguladoras. Una ventaja adicional es sin duda que al tratarse de células normales, no clonadas, los resultados que se obtengan utilizando este modelo podrán extrapolarse a los acontecimientos que tienen lugar *in vivo*.

## 1. ACCIÓN PROLIFERATIVA DE IGF-I SOBRE LAS CÉLULAS HIPOFISARIAS

Numerosos estudios señalan a IGF-I como un importante factor mitogénico e inductor de diferenciación de diversos tipos celulares (Conover, 1985; Renner, 1993; Takahashi, 1997; Oomizu, 1998). La presencia uniforme de IGF-I y la distribución de su receptor por toda la hipófisis anterior (Bach, 1992; Ren, 1994), sugieren que IGF-I puede ejercer un importante papel local mediante mecanismos autocrinos y/o paracrinos. Además, hay evidencia de múltiples acciones de los IGFs en la adenohipófisis sobre la proliferación de las células secretoras y la síntesis y secreción de hormonas hipofisarias.

Estos hechos nos llevaron a plantear si IGF-I podría tener una función proliferativa en concreto en la hipófisis de rata. Para valorar esta posible acción, se emplearon entre otras estrategias el análisis inmunocitoquímico con BrdU y la cuantificación de la proteína PCNA.

Nuestros resultados indican que **IGF-I ejerce una acción proliferativa sobre células hipofisarias de rata en cultivos primarios**. Esta respuesta es dosis dependiente, máxima con dosis de  $[10^{-8} \text{ M}]$  y  $[10^{-7} \text{ M}]$ , y tiempo dependiente, evidenciándose después de 48 horas de incubación con IGF-I y manteniéndose tras 72 horas de exposición (Figura 1). Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos que han demostrado que IGF-I induce la proliferación celular en la hipófisis de ratón (Oomizu, 1998). Además, en células tumorales hipofisarias, IGF-I promueve la proliferación de adenomas

hipofisarios humanos (Renner, 1993) y de las células GH3 (línea celular productora de PRL) (Hayashi, 1984).

Para confirmar la especificidad del IGF-I sobre la proliferación celular en la hipófisis, se realizaron experimentos bloqueando el IGF-I mediante el empleo de antisuero de IGF-I (As-IGF-I), y confirmaron que el IGF-I ejerce una acción mitogénica local específica sobre las células hipofisarias.

Una vez establecida la acción proliferativa de IGF-I sobre las células hipofisarias de rata, nos planteamos si IGF-I podría estimular la proliferación de algún tipo celular concreto de la hipófisis y si su acción podría ser directa o mediada por algún factor trófico hipofisario.

## **2. ACCIÓN PROLIFERATIVA DE IGF-I Y VIP SOBRE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS**

La proliferación de las células lactotropas hipofisarias está regulada por interacciones de señales hipotalámicas, periféricas y locales (Arita, 1998; Hashi, 1996; Oomizu, 1998). En los estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que tras 48 horas de exposición, IGF-I en células hipofisarias de rata, aumentaba los niveles de PRL en el medio y el contenido intracelular, sin modificar su expresión génica (Lara, 1994). Por lo tanto, este efecto de IGF-I podría ser secundario a un aumento en el número de las células lactotropas.

Otros estudios han sugerido el posible papel de IGF-I como factor proliferativo de las células lactotropas mediando acciones de estrógenos (Michels, 1993), dado que su administración produce un incremento de la expresión de IGF-I en la hipófisis.

Para valorar la acción de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas se emplearon técnicas de doble inmunofluorescencia en las células hipofisarias (Figura 5). Esta estrategia nos permite identificar y cuantificar la población de células lactotropas que proliferaban. Nuestros resultados demuestran que **IGF-I ejerce una acción proliferativa de las células**



**lactotropas de hipófisis de rata.** Este efecto se puso en evidencia después de 48 horas de incubación con IGF-I y se mantuvo a las 72 horas de exposición.

Estos datos confirman estudios previos realizados en ratón en los que se demostraba que el IGF-I sintetizado en la hipófisis incrementa la proliferación de las células corticotropas y lactotropas por un mecanismo autocrino o paracrino (Takahasi, 1997; Oomizu, 1998). Además, se ha observado que la insulina presenta acciones mitogénicas en las células lactotropas, a través del receptor de IGF-I (Suzuki, 1999). Existen datos recientes donde se ha demostrado que ratones con disrupción del gen de IGF-I presentan disminución en el número de las células lactotropas (Stefaneanu, 1999). También, en células tumorales hipofisarias, células GH3, IGF-I es necesario para su proliferación (Hayashi, 1984).

## **2.1. Participación de VIP endógeno en la acción de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas**

VIP es un neuropéptido que también se expresa en la adenohipófisis (Arnaout, 1986) donde es regulado por señales hipotalámicas, periféricas y locales (Lam, 1990; Balsa 1994; Lara, 1994).

Numerosos estudios han demostrado el importante papel que VIP desempeña en la regulación de PRL (Kato, 1978; Enjalbert, 1980). Además, trabajos previos han evidenciado la acción de VIP sobre el crecimiento de las células tumorales humanas de origen hipofisario (Pryor-Jones, 1989). Este hallazgo, junto al aumento de los niveles de VIP en la eminencia media e hipófisis durante el tratamiento con estrógenos sugieren que VIP medie, al menos en parte, la hiperplasia de las células lactotropas inducida por estrógenos (Pryor-Jones, 1988; Lam, 1990).

En este contexto nos planteamos si VIP podría tener una función proliferativa en las células lactotropas (Figura 6). Nuestros resultados son la primera evidencia de que **VIP estimula la proliferación de las células**

**lactotropas**, lo que confirma a VIP como un factor mitotrófico hipofisario capaz de inducir la proliferación de un tipo celular específico en la hipófisis de rata. Estos hallazgos están en concordancia con estudios recientes que han demostrado que el AMPc tiene un importante papel estimulador de la proliferación de las células lactotropas de rata (Suzuki, 1999).

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que IGF-I induce la expresión del ARNm de VIP en la hipófisis, así como su liberación al medio (Lara, 1994). Además, el aumento de PRL en el medio inducido por IGF-I, está mediado por la presencia de VIP. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que IGF-I y VIP interaccionen en su acción proliferativa sobre las células lactotropas.

Para profundizar en este supuesto, nos planteamos analizar el efecto conjunto de ambos factores tróficos, así como el papel de VIP como mediador de IGF-I sobre la proliferación de las células lactotropas (Figura 6 y 7). Los resultados obtenidos demuestran que **el bloqueo de VIP con un antisuero específico redujo significativamente la acción proliferativa de IGF-I**. La presencia simultánea de ambos factores no tuvo un efecto sinérgico. Ambos hallazgos sugieren que **IGF-I y VIP utilizan vías de señalización dependientes para ejercer su acción mitogénica sobre las células lactotropas**. Estos datos están de acuerdo con estudios recientes que han demostrado que el bloqueo de la vía AMPc/PKA inhibe la proliferación de las células lactotropas inducida por insulina (Suzuki, 1999).

Diversos trabajos han mostrado que IGF-I necesita la interacción con otros factores de crecimiento para estimular la síntesis de ADN y la proliferación celular (Jones, 1995). Las distintas fases del ciclo celular están controladas por proteínas cuya regulación se encuentra bajo el control de factores tróficos. Estudios previos han demostrado que el AMPc es capaz de cooperar con factores de crecimiento como la insulina o el IGF-I y facilitar su acción mitogénica (Roger, 1995; Kimura, 2001). Esta cooperación podría producirse a varios niveles: aumento de las ciclinas D y E y el acortamiento de la fase G1 del ciclo celular (Yamamoto, 1996); regulación de inhibidores de las

quinasas dependientes de ciclinas (cdki) o formación de complejos ciclinas-cdk y su importación al núcleo. Se ha demostrado que VIP es un factor mitogénico que promueve su acción por el acortamiento de las fases G1 y S del ciclo celular (Gressens, 1998) lo cual podría facilitar a otros factores tróficos, como IGF-I, su actuación dentro del ciclo celular.

En algunos estudios, se ha observado que VIP, a través de mecanismos autocrinos o paracrinos, podría indirectamente estimular la proliferación a largo plazo, mediante el control de la acción y la liberación de factores tróficos (Muller, 1995). En este sentido se ha demostrado que VIP regula la liberación de factores locales como galanina, la cual tiene un papel importante en la regulación de la liberación de PRL y la proliferación de las células lactotropas (Wynick, 1993).

En conjunto, lo que todas estas evidencias ponen de manifiesto es que múltiples factores tróficos, entre los que se encuentran IGF-I y VIP, utilizando distintos sistemas de receptor y de señalización, pueden interaccionar para promover acciones mitotróficas, lo que corrobora nuestros resultados.

## **2.2. Efecto de IGF-I sobre la síntesis y liberación de PRL**

La secreción de PRL está controlada por señales inhibitoras y estimuladoras de origen central hipotalámico que interactúan entre sí, que también dependen en su acción de la regulación ejercida por señales periféricas. Cada vez está más aceptado que la regulación de la secreción de PRL es muy dependiente de un sistema de regulación hipofisario autocrino/paracrino, en el que pueden estar implicadas varias señales locales (Wynick, 1993; Balsa, 1994; Lara, 1994). Estudios previos han demostrado que VIP estimula la liberación de PRL actuando directamente a nivel hipofisario (Kato, 1978; Enjalbert, 1980). Como hemos observado en nuestro laboratorio, VIP tiene un efecto estimulador rápido de la liberación de PRL, que se pone de manifiesto tras una hora de exposición a VIP (Lara, 1991). Además, nuestros estudios previos han demostrado que IGF-I aumenta los niveles de PRL en el

medio de incubación a las 48 horas de exposición, sin modificar su expresión génica, y que este efecto está específicamente mediado por VIP (Lara, 1994).

Todo ello, nos llevó a analizar el efecto de IGF-I sobre la síntesis y liberación de PRL y a valorarlo en función del número de las células lactotropas (Figura 9). Los resultados obtenidos demuestran que **el aumento de la liberación de PRL que se observa tras 48 horas de incubación con IGF-I, es debido al incremento en el número de las células lactotropas por la acción de IGF-I, y no al estímulo de la liberación de PRL**. El bloqueo de VIP afectaría a la acción mitogénica de IGF-I y como consecuencia a la liberación de PRL.

Cabría esperar una estimulación de la liberación de PRL en respuesta a IGF-I, ya que éste aumenta la liberación y la expresión de VIP en cultivos de hipófisis. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los descritos en otros trabajos, en los que VIP a las 48 horas no estimula la liberación de PRL (Lara, 1991). Es posible que en un modelo *in vitro* en el cual se produce una interrupción del control inhibitorio de dopamina, se produzca un aumento de la liberación basal de PRL, debida en parte a la disociación de dopamina de su receptor, y también a una acción autocrina/paracrina de VIP, puesto que de forma paralela desaparece la inhibición que dopamina ejerce sobre VIP hipofisario (Balsa, 1994). Por lo tanto, en este modelo *in vitro* donde existe una liberación basal de PRL elevada, es difícil detectar cambios en la liberación de PRL en respuesta a VIP. Apoyan esta hipótesis existen estudios previos, donde se ha demostrado que el AMPc incrementa la síntesis y la expresión de PRL en células hipofisarias, pretratadas con un análogo de dopamina (Maurer, 1982a).

### 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS

Una vez que confirmamos que IGF-I y VIP inducen la proliferación de las células lactotropas, nos planteamos clarificar los mecanismos de señalización celular mediante los cuales promueven este efecto.

#### 3.1. Participación de las vías MAPK, PKA y PI3'-Kinasa en la acción de IGF-I

Está bien establecido que las acciones de IGF-I están mediadas por un receptor del tipo tirosina quinasa que se expresa en las células hipofisarias (Goodyer, 1984; LeRoith 1995). La unión de IGF-I a su receptor conlleva la activación de las vías Ras/MAPK y PI3'-Kinasa.

En este estudio, además comprobamos la participación de VIP en la proliferación de las células lactotropas inducida por IGF-I y el importante papel que juega la vía AMPc/PKA en este efecto (Suzuki, 1999).

Por todo ello, nos planteamos analizar la posible participación de la ruta AMPc/PKA en la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas. Los datos obtenidos a lo largo de este estudio demuestran que **IGF-I ejerce su efecto proliferativo sobre las células lactotropas a través de la vía Ras/MAPK** ya que la inhibición de esta vía con un inhibidor específico bloquea totalmente este efecto (Figura 10). Por otro lado, la inhibición de la vía PKA con un antagonista competitivo bloqueó parcialmente la acción proliferativa de IGF-I, lo cual sugiere que **la actividad de la PKA, inducida por VIP endógeno, está implicada en la vía de señalización que media la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas** (Figura 11).

Estos hallazgos están en concordancia con estudios recientes que han demostrado que la actividad mitogénica de la insulina sobre las células lactotropas se produce vía Ras/MAPK, pero es significativamente atenuada por

el bloqueo de la PKA (Suzuki, 1999). El mecanismo de señalización de IGF-I ha sido estudiado extensivamente en las células PC12, en las cuales promueve proliferación celular, principalmente a través de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) (Foncea, 1997), lo cual apoya nuestros resultados. Numerosos trabajos han mostrado el importante papel de la vía MAPK en la mediación de efectos mitogénicos (Whitmarsh, 2000; Pearson, 2001). La vía MAPK regula la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, así como también promueve la síntesis de proteínas. Además, recientemente se ha demostrado que controla la síntesis de ADN y ARN (Graves, 2000), necesaria para la replicación de los cromosomas y el aumento de la expresión génica para formar nuevas proteínas.

La participación de la ruta de la PKA en la acción mitogénica de IGF-I podría explicarse basándonos en estudios previos donde se ha observado que el AMPc, a través de la PKA, es capaz de regular la activación del coactivador transcripcional CBP, el cual juega un papel crítico en la expresión génica (Arias, 1994; Grewal, 2000b). Algunos estudios han sugerido que las vías MAPK y PKA podrían promover conjuntamente la activación de determinados factores transcripcionales o coactivadores, cuyas interacciones son necesarias para inducir la expresión génica y promover la proliferación celular (Roger, 1995; Kievit, 2001).

Por otro lado, la actividad de la PKA podría ser necesaria para la traslocación nuclear de ERK 1/2 y Rsk2 (Impey, 1998), donde activan proteínas quinasas y una serie de factores de transcripción que inducen la expresión génica (Treisman, 1996).

Otro posible nivel de interacción de estas vías podría ser la regulación de la expresión de genes de expresión temprana. Se ha observado que la activación simultánea de las vías MAPK y PKA resulta en un aumento sinérgico de la actividad del promotor de c-fos (Seternes, 1998).

Además, como hemos comentado anteriormente existen estudios que han demostrado que el AMPc es capaz de cooperar con IGF-I en su acción

mitogénica regulando componentes del ciclo celular como las ciclinas, la formación de complejos ciclinas-cdk y su importación al núcleo (Kievit, 2001), que contribuirían al acortamiento de la fase G1 y S, así como a la progresión del ciclo celular. Trabajos sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular, indican que la síntesis de ADN, resulta principalmente de acciones complementarias de la vía AMPc/PKA y MAPK, más que de interacciones en pasos tempranos de las cascadas de señalización.

Por otro lado, estudios previos indican que la activación de la vía Akt/PKB, además de mediar efectos metabólicos de IGF-I, protege a las células de la apoptosis (Downward, 1998). Numerosos trabajos han demostrado que IGF-I, a través de la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt promueve la supervivencia celular (Dudek, 1997; Datta, 1997; Kulik, 1997). Además, se ha sugerido que la vía PI3'-Kinasa podría mediar acciones proliferativas (Scrimgeour, 1997; Dufourny, 1997). Ello nos llevó a analizar el papel de la vía PI3'-Kinasa en la acción proliferativa de IGF-I sobre las células lactotropas (Figura 11). Nuestros resultados demuestran que **la vía PI3'-Kinasa no participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas.**

### 3.2. Participación de las vías MAPK y PKA en la acción de VIP

VIP ejerce sus acciones principalmente a través del aumento de la síntesis de AMPc y la activación de la PKA. El AMPc intracelular regula la proliferación celular en una variedad de tipos celulares (Dumont, 1989; Roger 1995; Graves, 1996). Además, la vía MAPK tiene un papel importante en el control de la proliferación celular en respuesta a AMPc, como se ha puesto de manifiesto recientemente (Suzuki, 1999; Kimura, 2001).

Por ello nos planteamos analizar la participación de la vía AMPc/PKA y la vía MAPK en la acción proliferativa de VIP (Figura 12). Los datos obtenidos demuestran que **la vía AMPc/PKA es determinante en la acción**

**proliferativa de VIP sobre las células lactotropas**, ya que la inhibición de esta vía con un antagonista competitivo bloquea totalmente este efecto. Por otro lado, la inhibición de la vía MAPK bloqueó parcialmente la acción proliferativa de VIP. Estos datos indican que **la vía MAPK participa en la acción mitogénica de VIP sobre las células lactotropas**.

Estos resultados están de acuerdo con estudios que han demostrado que la vía AMPc/PKA tiene un importante efecto estimulador en la regulación de la proliferación de las células lactotropas (Suzuki, 1999). Además, estos autores mostraron que el AMPc necesita la activación de la vía MAPK para inducir la proliferación celular. Otros autores han evidenciado que la activación de la vía MAPK es necesaria en la regulación de la expresión génica inducida por AMPc (Vossier, 1997; Grewal, 2000b; Kievit, 2001). En estos estudios se sugiere que la vía MAPK podría regular la activación de factores de transcripción específicos o de coactivadores necesarios para la expresión génica. Entre estos factores de transcripción se encuentra Elk-1, el cual junto a CREB estimulan la activación génica a través de un mecanismo cooperativo (Ginty, 1994; Bonni, 1995).

Además de la posible cooperación de ambas vías en la regulación de eventos a nivel transcripcional, la vía MAPK tiene un importante papel en el control de la proliferación celular. Anteriormente hemos descrito que la activación de esta vía promueve la síntesis de proteínas, controla directamente la síntesis de ADN y ARN, así como la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Whitmarsh, 2000). La vía MAPK además, podría contribuir a la regulación de componentes del ciclo celular necesarios para inducir la proliferación celular (Kimura, 2001).

Todos estos hallazgos confirman la existencia de múltiples interacciones entre diversas vías de señalización, lo cual apoya nuestros resultados, que demuestran un nuevo modelo de señalización en la regulación de la proliferación de las células lactotropas en la hipófisis.



#### 4. ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE IGF-I Y VIP

En este estudio, como se ha expuesto anteriormente, se confirma cómo la interrelación entre IGF-I y VIP en la hipófisis facilita la inducción de la proliferación de las células lactotropas. Nos planteamos por lo tanto analizar a qué nivel, dentro de los mecanismos de señalización intracelular, podría tener lugar esta interacción.

En primer lugar confirmamos la activación de la vía MAPK por IGF-I. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que **IGF-I activa la MAPK (ERK 1/2) en las células hipofisarias**. El análisis de la fosforilación y la activación de ERK 1/2 por IGF-I, demuestra que alcanza niveles máximos a los 2 minutos y declina rápidamente (Figura 13).

Estos datos, junto al hecho de que esta vía es determinante en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas, sugieren que la vía MAPK estaría implicada en su acción proliferativa. Analizamos esta activación también en una línea celular productora de PRL, células GH4C1, y comprobamos una cinética similar en la activación de MAPK (ERK 1/2), por lo que podemos suponer que esta activación tiene lugar también en las células lactotropas de hipófisis de rata. Estos datos están en concordancia con estudios previos de otros autores, que encontraron una cinética de activación similar en la activación de la vía MAPK por IGF-I en dos líneas celulares productoras de PRL, células GH3 y GH4C1 (Castillo, 1997).

Por otro lado, también quisimos analizar la activación de la vía PI3'-Kinasa por IGF-I en nuestro modelo experimental. Los datos indican que **IGF-I activa la vía PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias**, y que por lo tanto esta ruta debe ser importante en la mediación de determinados efectos inducidos por IGF-I.

Comprobada la activación de la vía MAPK en respuesta a IGF-I, nos planteamos analizar la influencia de otras vías de señalización, como la PI3'-Kinasa y la PKA, sobre la activación de la vía MAPK. Trabajos previos han sugerido que puede existir interacción entre las vías MAPK y PI3'-Kinasa (Zimmermann, 1999). Además, anteriormente hemos demostrado que la PKA participa en la acción mitogénica de IGF-I. Nuestros resultados demuestran que **IGF-I induce directamente la activación de ERK 1/2, a través de Ras/Raf/MEK sin depender de otras vías de señalización**. También se demuestra que el inhibidor PD098059 es capaz de bloquear la activación de ERK 1/2 inducida por IGF-I, lo que avala la especificidad de la activación de MAPK por IGF-I.

Anteriormente hemos descrito que la vía MAPK participa en la acción proliferativa de VIP sobre las células lactotropas (Figura 12). Por ello, nos planteamos analizar si VIP inducía la activación de la vía MAPK. Los resultados obtenidos indican que **VIP activa la MAPK (ERK 1/2) en las células hipofisarias**, y que por lo tanto esta vía podría estar implicada en la acción de VIP sobre proliferación celular. El análisis de la cinética de activación de ERK 1/2 por VIP, demuestra que alcanza niveles máximos a los 2 minutos y que disminuye progresivamente hasta regresar a los niveles basales a los 60 minutos (Figura 17), en contraste de lo que ocurre con IGF-I donde a los 10 minutos regresaba a los niveles basales. Estudios en otros sistemas sugieren que la cinética de activación de la MAPK es crítica para la inducción de determinados efectos (Marshall, 1995).

Apoyando estos resultados, hay trabajos recientes que han demostrado que VIP activa la vía MAPK (ERK 1/2) en una línea celular productora de PRL, células GH4C1 (Le Péchon-Vallée, 2000). Pero además, nuestros hallazgos demuestran que **VIP induce la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) a través de la PKA**, ya que la inhibición de esta quinasa con un antagonista competitivo (Rp-cAMPS) bloqueó totalmente la activación de MAPK inducida por VIP (Figura 19). Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados en otra

línea celular, células GH3, en la cual la PKA es necesaria para la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por AMPc (Kievit, 2001).

Algunos trabajos han demostrado que la PKA activa selectivamente la vía MAPK a través de Rap1/B-Raf (Vossier, 1997; Grewal, 2000a; Kievit, 2001). La posible implicación que tendría la activación de la vía MAPK por la PKA, a través de Rap1, podría ser la activación de factores transcripcionales específicos o coactivadores que regulan la expresión génica. Así, se ha visto que el AMPc puede activar el factor transcripcional Elk-1 y regular la proliferación y diferenciación celular (Vossier, 1997). En la línea celular hipofisaria, GH3, el AMPc induce la regulación de la expresión génica de PRL, a través de un mecanismo dependiente de MAPK (Kievit, 2001; Yonehara, 2001).

Por otro lado, estudios recientes indican que el AMPc podría utilizar otras vías de señalización, además de la PKA para ejercer sus acciones biológicas. En este contexto, se han identificado unos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), los cuales abren nuevas vías de señalización en la acción del AMPc (Richards, 2001). Recientemente también se ha visto que en algunos tipos celulares, el AMPc podría controlar la exocitosis a través de estos GEFs (Ozaki, 2000). Estos factores, en función del tipo celular y el estadio del desarrollo, promueven la activación de pequeñas GTPasas como Ras que conducen a la activación de vías de señalización como la PI3'-Kinasa.

Por todo ello, nos planteamos analizar si VIP activaba la vía PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias (Figura 18). Los resultados obtenidos demuestran que **no hay activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt por VIP en las células hipofisarias**, y que por lo tanto es una ruta que no parece mediar efectos de VIP sobre proliferación en este modelo experimental.

## 5. ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL CREB

IGF-I y VIP, tal y como hemos ido comentando, conducen a la activación de una serie de moléculas de señalización intracelular. Estas rutas de transducción de señales convergen en la activación de factores de transcripción, los cuales una vez activados se unen a elementos de respuesta específicos que se encuentran en diferentes genes, modulando la transcripción de los mismos.

Uno de los factores transcripcionales activado por estímulos extracelulares mejor caracterizado es CREB, el cual es crítico para promover una variedad de procesos celulares incluyendo la proliferación, diferenciación y supervivencia. Estudios previos han demostrado que CREB regula la transcripción de numerosos genes, en respuesta a diversos estímulos (Shaywitz y Greenberg, 1999). CREB es activado por una variedad de proteínas quinasas entre las que se incluyen la MAPK y la PKA. Por lo tanto, la modulación de este factor transcripcional nos podría ayudar a explicar no solamente los efectos que la inhibición de la PKA tiene sobre la proliferación de las células lactotropas en respuesta a IGF-I, sino también los efectos que la inhibición de la vía MAPK tiene sobre la proliferación inducida por VIP.

### 5.1. Participación de las vías MAPK y PKA en la acción de IGF-I sobre la activación de CREB

Se conoce el mecanismo mediante el cual los factores de crecimiento transmiten las señales al núcleo para activar la expresión génica. La vía Ras/MAPK activa la quinasa Rsk2, la cual media la fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) inducida por factores de crecimiento (Xing, 1996).

En primer lugar nos planteamos analizar la fosforilación y activación de CREB (Ser<sup>133</sup>) por IGF-I en las células hipofisarias (Figura 20). Los resultados obtenidos indican que **IGF-I activa CREB en las células hipofisarias**, lo cual sugiere su participación en la regulación de la expresión génica por este factor

de crecimiento. El análisis de la activación de CREB por IGF-I muestra que alcanza niveles máximos a los 10 minutos y declina rápidamente. Estos datos están de acuerdo con estudios realizados en células PC12, en los cuales IGF-I induce la fosforilación y activación de CREB (Pugazhenth, 1999a).

Dado que habíamos demostrado el importante papel mitogénico de IGF-I sobre las células lactotropas a través de la vía de señalización Ras/MAPK, quisimos comprobar, mediante estudios inmunocitoquímicos, si IGF-I activaba CREB en las propias células lactotropas (Figura 21). Estos resultados constituyen **la primera evidencia de la activación de CREB en las células lactotropas por IGF-I**, lo cual sugiere fuertemente su posible participación en la acción mitogénica de este factor de crecimiento.

Anteriormente hemos descrito que la vía PKA participa en la acción mitogénica de IGF-I sobre las células lactotropas. Por ello, nos planteamos analizar si existía interdependencia entre las vías de señalización MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA en la activación de CREB inducida por IGF-I. Los resultados indican que **IGF-I induce la activación de CREB a través de la vía Ras/MAPK**, ya que el bloqueo de esta vía, abole completamente la activación de este factor transcripcional (Figura 22). Estos datos están en concordancia con trabajos de Xing y Greenberg (1996) en los cuales la vía Ras/MAPK, a través de Rsk2, estimula la fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) inducida por factores de crecimiento.

Por otro lado, **la inhibición de la vía PKA no afecta a la activación de CREB por IGF-I**. Esto indicaría que la PKA no participa en la activación de CREB por IGF-I. Algunos trabajos demuestran un papel de la PKA en la traslocación nuclear de MAPK y de Rsk2, la cual es necesaria para la transcripción regulada por CREB (Impey, 1998). Los datos obtenidos sugieren que la PKA no tiene efecto sobre la activación de CREB en respuesta a IGF-I, pero hay que tener en cuenta que estos resultados se refieren a lo que acontece en toda la población hipofisaria y, por lo tanto no es representativo de lo que ocurre en las células lactotropas. Serían necesarios experimentos que demuestren cómo afecta el bloqueo de la PKA sobre la activación de CREB en

repuesta a IGF-I en las células lactotropas, para aclarar el papel de la PKA en la activación de CREB por IGF-I en dichas células.

## 5.2. Implicación de las vías MAPK y PKA en la acción de VIP sobre la activación de CREB

Estudios previos han demostrado que el AMPc regula la transcripción de numerosos genes a través de la activación de la PKA y la consecuente fosforilación de CREB (Ser<sup>133</sup>) (Montminy, 1997).

Por ello, nos planteamos en primer lugar analizar la fosforilación y activación de CREB (Ser<sup>133</sup>) por VIP. Los resultados muestran que **VIP activa CREB en las células hipofisarias**. La cinética de activación indica que alcanza niveles máximos rápidamente y se mantienen unos niveles elevados al menos durante 60 minutos (Figura 23). Estos resultados confirman la participación de CREB en la regulación de la transcripción génica inducida por VIP. Hay trabajos que han sugerido que la cinética de activación de CREB y las interacciones con otros factores transcripcionales son críticas para la regulación de determinados genes (Bonni, 1995). VIP podría contribuir de esta manera a la expresión de determinados genes relacionados con la proliferación celular.

Además, este trabajo demuestra que **la activación de CREB por VIP tiene lugar en las células lactotropas**, lo cual sugiere su posible participación en su acción mitogénica sobre este tipo celular.

Estudios previos y nuestros resultados indican que VIP induce la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) a través de la PKA (Le Péchon-Vallée, 2000). Por ello, nos planteamos analizar si existía interdependencia entre las vías de señalización AMPc/PKA y MAPK (ERK 1/2) sobre la activación de CREB en respuesta a VIP (Figura 25). Nuestros resultados indican que **VIP induce la activación de CREB directamente a través de la PKA**, ya que el bloqueo de esta quinasa, abole completamente la fosforilación de este factor transcripcional. Por otro lado, **la inhibición de la vía MAPK no afectó a la**

**activación de CREB inducida por VIP.** Estos resultados están en concordancia con trabajos recientes en los que han demostrado que el AMPc fosforila CREB (Ser<sup>133</sup>) directamente a través de la PKA (Grewal, 2000b).

## **6. ACCIÓN DE IGF-I Y VIP SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR DIFERENTES ELEMENTOS DE RESPUESTA**

IGF-I y VIP activan una serie de vías de señalización que convergen en la activación de factores de transcripción comunes, los cuales, una vez activados se unen a elementos de respuesta específicos que se encuentran en diferentes genes, modulando la transcripción de los mismos.

En este trabajo hemos demostrado que tanto IGF-I como VIP necesitan la participación de las vías MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA para inducir su acción mitogénica. Además, ambos factores tróficos promueven la activación del factor transcripcional CREB, el cual es crítico y necesario para la transcripción de numerosos genes (Shaywitz, 1999).

Por todo ello, nos propusimos estudiar si la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE, podría ser activada transcripcionalmente por IGF-I y VIP. Además, nos planteamos analizar si, a este nivel transcripcional, existía interrelación entre las vías de señalización de IGF-I y VIP en la regulación de la expresión de genes con estos elementos de respuesta.

Nuestros resultados muestran que **tanto IGF-I como VIP son capaces de aumentar la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE en la línea celular GH4C1.**

Estos elementos de respuesta se encuentran en multitud de genes, entre ellos genes relacionados con la proliferación celular. Por lo tanto, estos datos sugieren que IGF-I y VIP podrían inducir la proliferación celular por su

capacidad de actuar estimulando la expresión de genes implicados en acciones proliferativas.

Nos planteamos comprobar si, a este nivel, existía interdependencia entre las vías de señalización MAPK y la PKA en la regulación de la expresión génica controlada por el elemento de respuesta CRE (Figura 29). Nuestros resultados sugieren que **IGF-I necesita la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) para la regulación de la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE**. Anteriormente hemos mostrado que IGF-I induce la fosforilación y activación del factor transcripcional CREB a través de la vía MAPK. Estudios previos indican que los factores de crecimiento inducen la activación de CREB, vía Ras/MAPK (Xing, 1996). Además, esta activación estimula la capacidad de CREB para activar la transcripción de genes de expresión temprana en las células tratadas con factores neurotróficos (Ginty, 1994).

Además, **el bloqueo de la PKA atenuó marcadamente la activación transcripcional que IGF-I ejerce sobre genes regulados por el CRE**. Estudios previos han demostrado que el AMPc, a través de la activación de Rap1-ERK juega un papel importante en la activación del coactivador CBP y de componentes necesarios para inducir la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE (Grewal, 2000b; Kievit, 2001). Podría ser necesaria la activación de la vía PKA-Rap1-ERK, para que IGF-I pueda inducir la expresión de genes regulados por el CRE, lo cual explicaría nuestros resultados. Además, en una línea celular hipofisaria, AtT20, se ha demostrado que CBP es un coactivador transcripcional que puede ser regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear y AMPc (Chawla, 1998), los cuales pueden inducir su activación y la transcripción mediada por CREB-CBP. Por lo tanto, la acción combinada de las vías PKA y MAPK podrían conducir a la activación de diferentes factores de transcripción o coactivadores, cuyas interacciones son necesarias para la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Además, la PKA podría contribuir, con la cinética de activación de CREB, a la cooperación con



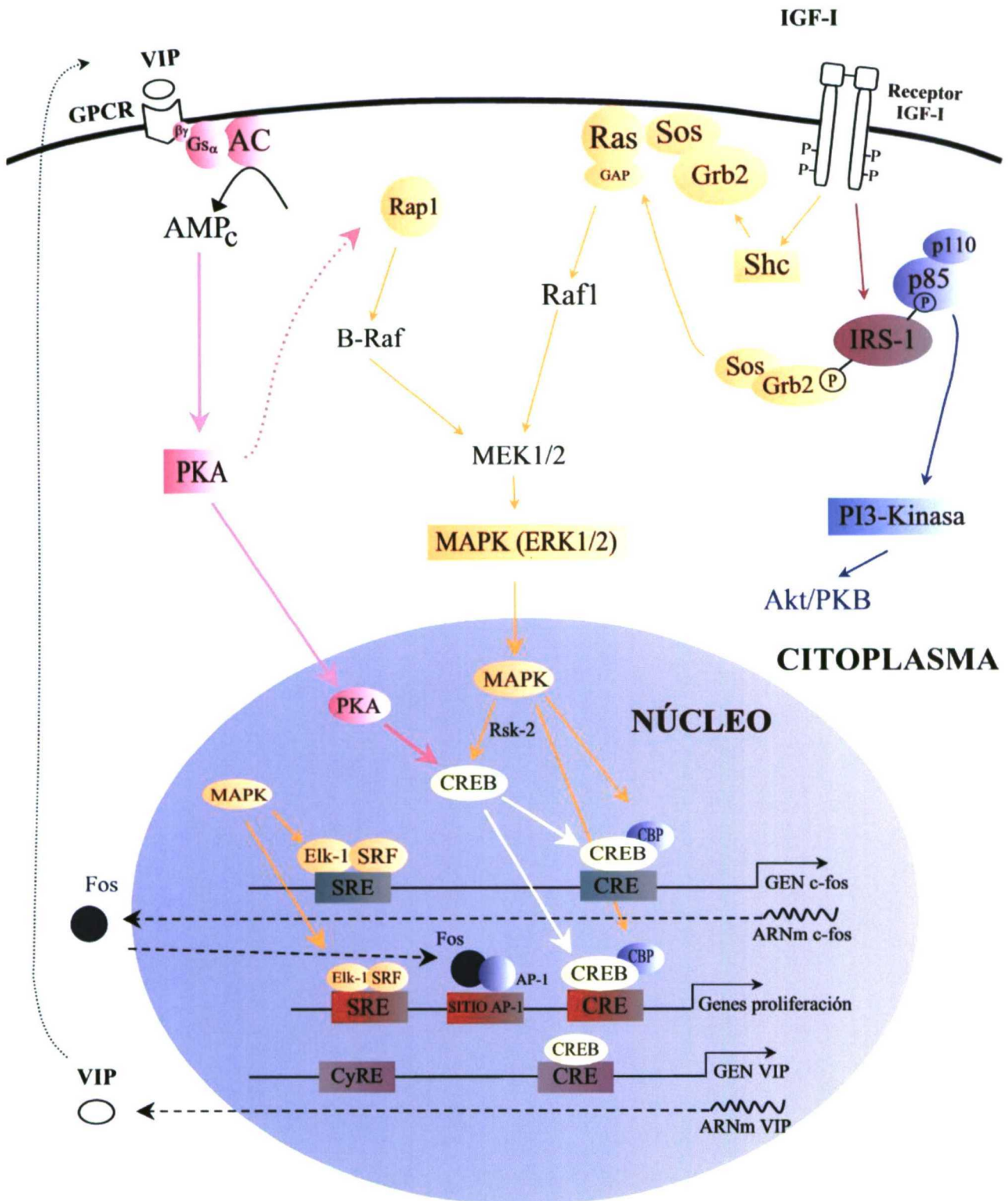
productos de genes de expresión temprana que permitiría la inducción de determinados genes de expresión tardía.

Por otro lado, Impey y cols. (1998) han propuesto que la interacción ERK 1/2 y PKA podrían facilitar la traslocación nuclear de las ERKs y facilitar la transcripción mediada por CREB. Anteriormente hemos mostrado que IGF-I no necesita la activación de la PKA para activar CREB. Sin embargo, dado que estos estudios de activación de CREB están realizados en toda la población de células hipofisarias, serían necesarios otro tipo de estudios para aclarar si la PKA participa o no en la activación de CREB en respuesta a IGF-I en las células lactotropas. Esto nos permitiría responder a la hipótesis de si la PKA promueve la traslocación nuclear de ERK 1/2. Podrían existir otros niveles de interacción que expliquen la dependencia de la activación de la vía AMPc/PKA por IGF-I, para inducir la proliferación de las células lactotropas. Así, la PKA podría también regular componentes del ciclo celular que facilitarían la acción proliferativa de IGF-I.

Cuando analizamos la interdependencia entre las vías MAPK y PKA en la regulación de la expresión génica controlada por el CRE en respuesta a VIP (Figura 30), encontramos que **VIP necesita la activación de la vía AMPc/PKA y la vía MAPK (ERK 1/2) para la regulación de la expresión de genes controlados por el CRE**. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que demuestran que el AMPc fosforila y activa CREB directamente a través de la PKA, pero requiere la vía Rap1-ERK para el reclutamiento y activación del coactivador CBP y otros componentes necesarios para inducir la expresión génica regulada por el CRE (Grewal, 2000b). Estudios recientes describen un modelo para explicar la transcripción de PRL inducida por AMPc en las células GH3, y sugieren que la vía AMPc/PKA, a través de Rap1-ERK, promueve la estimulación del coactivador transcripcional CBP (Kievit, 2001). Además, la vía MAPK regula la activación de factores transcripcionales como Elk-1, el cual junto a CREB estimulan la activación génica a través de un mecanismo cooperativo (Ginty, 1994; Bonni, 1995). Por lo tanto, es probable que las acciones de diferentes señales contribuyan a la expresión génica mediada por

CREB. Además de la regulación de la expresión de genes, la vía MAPK podría contribuir a la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas necesarias para la proliferación celular (Whitmarsh, 2000).

En conjunto, nuestros resultados los podemos esquematizar como se representan en la Figura 7.



**Figura 7.** Modelo de acción de IGF-I y VIP sobre la proliferación de las células lactotropas hipofisarias.

## 7. ACCIÓN DE IGF-I SOBRE LA PREVENCIÓN DE LA APOPTOSIS

Estudios previos han demostrado que IGF-I además de su acción proliferativa, previene la apoptosis en diversos tipos celulares. En células hipofisarias de *tilapia* se ha demostrado que IGF-I inhibe la apoptosis (Melamed, 1999). En otros trabajos realizados en células PC12 se ha demostrado que IGF-I regula la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, a través de la activación de la PI3'-Kinasa/Akt (Pugazhenthí, 2000). Además, hay evidencia de que IGF-I promueve el incremento de la expresión de Bcl-xL (Párrizas, 1997a).

Por ello nos planteamos analizar si IGF-I podría tener una función anti-apoptótica en las células hipofisarias. Para valorar esta posible acción, se cuantificaron los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura 31). Nuestros resultados indican que **IGF-I incrementa los niveles de Bcl-2 en las células hipofisarias**. Estos datos constituyen la primera demostración que evidencia la inducción de la proteína Bcl-2 por la acción de IGF-I en células hipofisarias, lo que sugiere que éste factor podría ejercer una función anti-apoptótica en estas células.

En concordancia con nuestros resultados hay estudios que han demostrado que IGF-I regula la expresión de Bcl-2 en las células PC12 (Pugazhenthí, 1999b; 2000), así como también puede regular otros miembros de la familia Bcl-2 (Párrizas, 1997a). La familia Bcl-2 es importante en la regulación del proceso de apoptosis de muchos tipos celulares (Sato, 1994). Bcl-2 es capaz de bloquear la apoptosis y proteger a las células de una gran variedad de estímulos apoptóticos (Boise, 1993).

Además, nos planteamos analizar el mecanismo mediante el cual IGF-I induce la proteína Bcl-2. Datos recientes han mostrado que IGF-I regula la expresión de Bcl-2, a través de la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt (Pugazhenthí, 2000). En este estudio hemos comprobado que **IGF-I activa la vía de señalización PI3'-Kinasa/Akt en las células hipofisarias**. Además, el

análisis de la fosforilación y activación de Akt por IGF-I, demuestra que alcanza niveles altos de forma rápida y se mantienen elevados hasta los 60 minutos, por lo tanto es una ruta importante en la mediación de determinados efectos.

Por todo ello, nos planteamos analizar la participación de esta vía de señalización sobre la inducción de la proteína Bcl-2 por IGF-I en las células hipofisarias (Figura 32). Los datos presentados en este trabajo muestran que **IGF-I, a través de la vía PI3'-Kinasa regula la expresión de Bcl-2**, ya que la inhibición de esta vía con un inhibidor específico bloquea totalmente este efecto.

Apoyando estos datos, otros trabajos han demostrado que la quinasa Akt, activada por la PI3'-Kinasa, es un mediador crítico en la supervivencia celular inducida por IGF-I (Dudek, 1997; Datta, 1997). Varios trabajos han demostrado que la inhibición de la PI3'-Kinasa bloquea la capacidad de ciertos factores tróficos para proteger a las células de la muerte celular programada (Yao, 1995; 1996; Bai, 1999), lo cual apoya nuestros resultados.

Estos datos no descartan que la vía MAPK pudiera tener algún papel en el efecto anti-apoptótico de IGF-I sobre las células hipofisarias. Se ha demostrado, en células neuronales de cerebelo, que el factor neurotrófico BDNF, es capaz de promover la supervivencia celular, a través de la vía de señalización Ras/MAPK (Bonni, 1999).

Uno de los componentes por los cuales los factores de crecimiento suprimen la apoptosis y promueven la supervivencia celular es mediante la fosforilación e inhibición del miembro de la familia Bcl-2, Bad a través de la vía PI3'-Kinasa (Datta, 1997; 1999). Por ello nos planteamos analizar el efecto de IGF-I sobre la fosforilación de Bad en la serina 136 (Ser<sup>136</sup>) (Figura 33). Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que **IGF-I fosforila e inhibe Bad (Ser<sup>136</sup>) en las células hipofisarias, suprimiendo de esta forma la apoptosis e induciendo supervivencia celular.**

Estos datos están en concordancia con estudios previos que han demostrado que IGF-I, a través de Akt, puede bloquear la muerte celular induciendo la fosforilación de Bad (Ser<sup>136</sup>) (Datta, 1997). Este efecto promueve la disociación de Bad de las proteínas anti-apoptóticas y su asociación con proteínas citoplásmicas 14-3-3.

Todos estos datos indican que esta acción se produce principalmente por la vía PI3'-Kinasa/Akt activada por IGF-I, ya que algunos estudios han demostrado que Akt puede fosforilar Bad en la serina 136, lo cual conduce a su inactivación y a la supervivencia celular (Datta, 1999).

# **CONCLUSIONES**

**1.-** IGF-I ejerce una acción proliferativa sobre células hipofisarias, concretamente sobre las células lactotropas. Esta acción mitotrófica puede conducir a un incremento en la liberación de PRL como consecuencia del aumento del número de las células lactotropas.

**2.-** IGF-I requiere la presencia de VIP para ejercer su acción proliferativa sobre las células lactotropas, ya el bloqueo de VIP endógeno abole parcialmente la acción de IGF-I. Probablemente VIP actúe de forma autocrina y/o paracrina, uniéndose a receptores específicos para iniciar su vía de señalización y activación de la PKA.

**3.-** VIP estimula la proliferación de las células lactotropas en cultivos primarios de células hipofisarias. La presencia simultánea de IGF-I y VIP no tiene efecto sinérgico en la proliferación de las células lactotropas, lo que sugiere la existencia de rutas de señalización comunes o dependientes.

**4.-** IGF-I ejerce su acción proliferativa sobre las células lactotropas a través de la vía de señalización Ras/MAPK. Además, IGF-I induce directamente la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) en las células hipofisarias.

La activación de la PKA, probablemente inducida por VIP endógeno, es necesaria en el mecanismo de señalización que media la acción mitogénica de IGF-I.

**5.-** La vía AMPc/PKA es determinante en la acción proliferativa de VIP sobre las células lactotropas.

La vía de señalización MAPK participa en la acción mitogénica de VIP. Además, VIP induce la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) a través de la PKA.

**6.-** IGF-I induce la activación del factor transcripcional CREB en las células lactotropas. La vía de señalización Ras/MAPK es esencial en la activación de CREB.



**7.-** VIP promueve la activación de CREB en las células lactotropas. Además, VIP induce la activación de CREB a través de la vía de señalización AMPc/PKA.

**8.-** IGF-I y VIP son capaces de inducir la expresión de genes regulados por los elementos de respuesta SRE y CRE en la línea celular hipofisaria GH4C1.

**9.-** IGF-I induce la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE a través de la activación de las vías de señalización MAPK (ERK 1/2) y PKA.

**10.-** VIP requiere la activación de las vías de señalización AMPc/PKA y MAPK (ERK 1/2) para inducir la expresión de genes regulados por el elemento de respuesta CRE.

**11.-** IGF-I regula la expresión y la actividad de miembros de la familia Bcl-2 a través de la activación de la vía PI3'-Kinasa/Akt, lo cual sugiere que tenga una acción anti-apoptótica en las células hipofisarias.

# **BIBLIOGRAFIA**

- **Abe H, Engler D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Reichlin S.** 1985. Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. *Endocrinology* 116: 1383-1390.
- **Abraham GE, Gover PK.** 1991. Covalent linkage of hormonal haptenes to protein carriers for use in radioimmunoassay. In Odel WD Daughaday WH, eds *Principles of competitive protein-binding assays* Lippincott, Philadelphia: 134.
- **Abraham EJ, Faught WJ, Frawley LS.** 1998. Transforming growth factor 1 is a paracrine inhibitor of prolactin gene expression. *Endocrinology* 139: 5174-5181.
- **Adamo ML, Lanazu F, Neuenschwander S, Werner H, LeRoith D, Roberts CT.** 1993. Distint promoters in the rat insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene are active in CHO cells. *Endocrinology* 132: 935-937.
- **Aguado F, Sánchez-Franco F, Cacicedo L, Fernández T, Rodrigo J, Martínez-Murillo R.** 1992. Subcellular localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) in Purkinje cells of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neuroscience Letter* 135:171-174.
- **Aihua C, Hayes JD, Patel N, Hyde JF.** 1999. Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. *Endocrinology* 140: 4955-4964.
- **Andries M, Vande Vijver V, Tilemans D, Bert C, Deneef C.** 1995. Interaction of  $\alpha$ T3-1 cells with lactotropes and somatotropes of normal pituitary *in vitro*. *Neuroendocrinology* 61: 326-336.
- **Apud JA, Cocchi D, Locatelli V, Masotto C, Muller EE, Racagni G.** 1989. Biochemical and functional aspects on the control of prolactin release by the hypothalamo-pituitary GABAergic system. *Psychoneuroendocrinology* 14: 3-17.

- **Aragay AM, Katz A, Simon MI.** 1992. The  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{11}$  proteins couple the thyrotropin releasing hormone receptor to phospholipase C in GH<sub>3</sub> rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 267: 24983-24988.
- **Arey BJ, Freeman ME.** 1989. Hypothalamic factors involved in the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 124: 878-883.
- **Arey BJ, Freeman ME.** 1990. Oxytocin, vasoactive intestinal peptide and serotonin regulate the mating-induced surges of prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 126: 279-284.
- **Arey BJ, Freeman ME.** 1992. Activity of vasoactive intestinal peptide and serotonin in the paraventricular nucleus reflects the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 131: 736-742.
- **Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M.** 1994. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370: 226-229.
- **Arita J, Kojima Y, Yamamoto I, Mazawa S, Kimura PM.** 1994. Somatotropes and thyrotropes in the rat anterior pituitary gland cosecrete substance P: analysis by the sandwich cell immunoblot assay. *Neuroendocrinology* 60: 567-574.
- **Arita J, Hashi A, Hoshi K, Mazawa S, Suzuki S.** 1998. D<sub>2</sub> Dopamine-receptor-mediated inhibition of proliferation of rat lactotropes in culture is accompanied by changes in cell shape. *Neuroendocrinology* 68: 163-171.
- **Arnaout MA, Garthwaite TL, Martinson DR, Hagen TC.** 1986. Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissue. *Endocrinology* 119: 2052-2057.

- **Bach MA, Bondy CA.** 1992. Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131: 2588-2594.
- **Backer JM, Myers Jr MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF.** 1992. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11:3469-3479.
- **Bai H, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH.** 1999. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of Bad by PI3'-K-dependent pathway. *Circulation Research* 85: 229-237.
- **Balsa JA.** Acción autoparacrina del péptido intestinal vasoactivo en el control hipotalámico de la secreción de prolactina. Tesis Doctoral. Madrid 1994.
- **Balsa JA, Cacicedo L, Lara JI, Lorenzo MJ, Pazos F, Sánchez-Franco F.** 1996a. Autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release. *Endocrinology* 137: 144-150.
- **Balsa JA, Sánchez-Franco F, Lorenzo MJ, Pazos F, Lara JI, Cacicedo L.** 1996b. Autoparacrine action of vasoactive intestinal peptide on dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 137: 508-513.
- **Balsa JA, Sánchez-Franco F, Pazos F, Lara JI, Lorenzo MJ, Maldonado G, Cacicedo L.** 1998. Direct action of serotonin on prolactin, growth hormone, corticotropin and luteinizing hormone release in cocultures of anterior and posterior pituitary lobes: autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 68: 326-333.
- **Barron SE, Hoover DB.** 1983. Localization of acetyl-cholinesterase and choline acetyltransferase in the rat pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 1087-1098.

- **Baserga R, Sell C, Porcu P, Rubini M.** 1994. The role of the IGF-1 receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Prolif.* 27: 63-71.
- **Bayne ML, Apphebaum J, Underwood D, Chicchi GG, Green BG, Hayes NS, Cascieri MA.** 1989. The C region of human insulin-like growth factor (IGF-I) is required for high affinity binding to the type I IGF-I receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 11004-11008.
- **Begeot M, Hemming FJ, DuBois PM.** 1984. Induction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone  $\alpha$ -subunit. *Science* 226: 566-568.
- **Ben-Jonathan N.** 1980. Catecholamines and pituitary prolactin release. *J. Reprod. Fertil* 58: 501-512.
- **Ben-Jonathan N, Liu J-W.** 1992. Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine, and autocrine interactions. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 254-258.
- **Ben-Jonathan N.** 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews* 22: 724-763.
- **Bjorklund A, Moore RY, Nobin A, Stenevi V.** 1973. The organization of the tubero-hypophysial and reticulo-infundibular catecholamine neuro system in the rat brain. *Brain Res.* 51: 171-191.
- **Blum M, McEwen BS, Roberts JL.** 1981. Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *J. Biol. Chem.* 262: 817-821.
- **Blum M, McEwen BS, and Roberts JL.** 1987. Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *J. Biol. Chem.* 262: 817-821.

- **Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Núñez G, Thompson CB.** 1993. Bcl-x, a Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608.
- **Bonni A, Ginty DD, Dudek H, Greenberg ME.** 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Molecular and Cellular Neuroscience* 6: 168-183.
- **Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME.** 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signalling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286: 1358-1362.
- **Brann CW, Putnam CD, Mahesh VB.** 1990. Corticosteroid regulation of gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 126: 159-166.
- **Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH.** 1995. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation and cellular localization in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 136: 2928-2936.
- **Brownstein MJ, Eskay RL, Palkovits M.** 1982. Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 2: 197-201.
- **Burikhanov R, Coulonval K, Pirson I, Lamy F, Dumont JE, Roger PP.** 1996. Thyrotropin via cyclic AMP induces insulin receptor expression and insulin co-stimulation of growth and amplifies insulin and insulin-like growth factor signaling pathways in dog thyroid epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 29400-29406.
- **Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D.** 1998. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 121:19-26.

- **Cai A, Bowers RC, Moore JrJP, Hyde JF.** 1998. Function of galanin in the anterior pituitary of estrogen-treated Fischer 344 rats: autocrine and paracrine regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 139: 2452-2458.
- **Caligaris L, Taleisnik S.** 1974. Involvement of neurones containing 5-hydroxytryptamine in the mechanism of prolactin release induced by oestrogen. *J. Endocrinology* 62: 25-33.
- **Calleja V, Ruiz Enríquez P, Filloux Ch, Peraldi P, Baron V, Van Obberghen E.** 1997. The effect of cyclic adenosine monophosphate on the mitogenic-activated protein kinase pathway depends on both the cell type and the type of tyrosine kinase-receptor. *Endocrinology* 138: 1111-1120.
- **Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY.** 1981. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J. Neuroscience* 11: 1289-1303.
- **Carmeliet P, Deneef C.** 1989. Synthesis and release of acetylcholine by normal and tumoral pituitary corticotrophs. *Endocrinology* 124: 2218-2227.
- **Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Santos M, Blanco J, Vázquez R.** 1995. In vitro morphometric and proliferative variations in VIP-immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology* 62: 277-282.
- **Carretero J, Vázquez RJ, Santos M, Cacicedo L, Rubio M, Sánchez-Franco F, Vázquez R.** 1996. Dopamine inhibits in vitro release of VIP and proliferation of VIP-immunoreactive pituitary cells. *Neuropeptides* 30: 81-86.
- **Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Cabo JJ, Vázquez G, Santos M, Pérez RM, Vázquez R.** 1997. Corticosterone induces hypoactivity of prolactin-immunoreactive cells. *Acta Anat.* 160: 15-20.



- **Carrillo AJ, Pool TB, Sharp ZD.** 1985. Vasoactive intestinal peptide increase prolactin messenger ribonucleic acid content in GH3 cells. *Endocrinology* 116: 202-206.
- **Carrillo AJ, Phelps CJ.** 1992. Quantification of vasoactive intestinal peptide immunoreactivity in the anterior pituitary glands of intact male and female, ovariectomized and estradiol benzoate-treated rats. *Endocrinology* 131: 964-969.
- **Cascieri MA, Saperstein R, Hayes NS, Green BG, Chicchi GG, Applebaum J, Bayne ML.** 1988. Serum half-life and biological activity of mutants of human insulin-like growth factor (IGF-I) which do not bind to serum binding proteins. *Endocrinology* 123: 373-381.
- **Castillo AI, Aranda A.** 1997. Differential regulation of pituitary-specific gene expression by insulin-like growth factor-I in rat pituitary GH4C1 and GH3 cells. *Endocrinology* 138: 5442-5451.
- **Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H.** 1998. CBP: A signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM Kinase IV. *Science* 281: 1505-1509.
- **Chen HT, Bradley CJ, Meites J.** 1976. Stimulation of carcinogen-induced mammary tumor growth in rats by adrenalectomy. *Cancer Res.* 36: 1414-1417.
- **Chen RH, Sarnecki C, Blenis J.** 1992. Nuclear localization and regulation of ERK- and Rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12: 915-927.
- **Chen RH, Abate C, Blenis J.** 1993. Phosphorylation of c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-Kda ribosomal S6 Kinase. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 90: 10952-10956.
- **Chen RH, Juo PC, Curran T, Blenis J.** 1996. Phosphorylation of c-Fos at the c-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12: 1493-1502.

- **Chew L-J, Pardy K, Murphy D, Carter DA.** 1996. Anterior pituitary vasoactive intestinal peptide mRNA is colocalised with prolactin mRNA in hyperoestrogenised rats. *J. Mol. Endocrinology* 16: 211-220.
- **Childs GV, Patterson J, Unabia G, Rougeau D, Wu P.** 1991. Epidermal growth factor enhances ACTH secretion and expression of POMC mRNA by corticotropes in mixed and enriched cultures. *Mol. Cell. Neuroscience* 2: 235.
- **Childs GV, Rougeau D, Unabia G.** 1995. Corticotropin-releasing hormone and epidermal growth factor: mitogens for anterior pituitary corticotropes. *Endocrinology* 136: 1595-1602.
- **Chiocchio SR, Cannata MA, Cordero JR, Tramezzani JH.** 1977. Involvement of adenohipophysial dopamine in the regulation of prolactin release during suckling. *Endocrinology* 105: 544-547.
- **Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH.** 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-859.
- **Chuang TT, Caccavelli L, Kordon C, Enjalbert A.** 1993. Protein kinase C regulation of prolactin gene expression in lactotroph cells: involvement in dopamine inhibition. *Endocrinology* 132: 832-838.
- **Cimini V.** 1996. Galanin inhibits ACTH release in vitro and can be demonstrated immunocytochemically in dispersed corticotrophs. *Exp. Cell. Res.* 228: 212-215.
- **Cohen IR, Wise PM.** 1988. Effects of estradiol on the diurnal rhythm of serotonin activity in microdissected brain areas of ovariectomized rats. *Endocrinology* 122: 2619-2625.
- **Cohen LE, Wondisford FE, Radovick S.** 1996. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 25: 523-540.

- **Conover Ca, Hintz RL, Rosenfeld RG.** 1985. Comparative effects of somatomedin C and insulin on the metabolism and growth of cultured human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 122:133-141.
- **Cooke RM, Harvey TS, Campell ID.** 1991. Solution structure of human insulin-like growth factor I: a nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics study. *Biochemistry* 30: 5484-5491.
- **Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR.** 1997. The mitogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signalling pathways. *J. Biol. Chemistry* 272: 6653-6662.
- **Cote TE, Grewe CW, Tsuruta GK, Stoof JC, Eskay RL, Kebabian JW.** 1982. D2 dopamine receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in the intermediate lobe of the rat pituitary gland requires guanosine 5'-triphosphate. *Endocrinology* 110: 812-819.
- **Couly G, Le Douarin NM.** 1988. The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development* 103: 101-113.
- **Cramer CR, Parker OM Jr, Porter JC.** 1979. Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 104: 419-422.
- **Dasen JS, Rosenfeld MG.** 2001. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu. Rev. Neuroscience* 24: 327-355.
- **Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.** 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
- **Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13: 2905-2927.

- **Daughaday WH, Hall K, Probe MS, Satrion Wd, Van der Brande JL, Van Wyk JJ.** 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature London* 235:187-189.
- **Daughaday WH, Rotwein P.** 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Reviews* 10:68-91.
- **David I, Bosshard R, Kloas W, Reinecke M.** 2000. Insulin-like growth factor I in the anterior pituitary of the clawed frog *Xenopus laevis*: immunocytochemical and autoradiographic indication for a paracrine action and corelease with prolactin. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 415-420.
- **Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Núñez G.** 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-689.
- **Demarest KT, McKay DW, Riegle GD, Moore KE.** 1983. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* 36: 130-137.
- **Denef C, Baes M, Schramme C.** 1984. Stimulation of prolactin secretion after short term or pulsatile exposure to dopamine in superfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 114: 1371-1378.
- **Denef C, Baes M, Schramme C.** 1986. Paracrine interactions in the anterior pituitary: role in the regulation of prolactin and growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, edited by Ganong WF and Martini L. New York: Raven Press: 115-148.
- **De Paul AL, Pons P, Aoki A, Torres AI.** 1997. Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochemistry* 99: 277-289.

- **Dhanasekaran N, Reddy EP.** 1998. Signalling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17: 1447-1455.
- **Diamond SE, Chiono M, Gutierrez-Hartmann A.** 1999. Reconstitution of the protein kinase A response of the rat prolactin promoter: differential effects of distinct Pit-1 isoforms and functional interaction with Oct-1. *Mol. Endocrinol.* 13: 228-238.
- **Downward J.** 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology* 10:262-267.
- **Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME.** 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665.
- **Dufourny B, Ablas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS.** 1997. Mitogenic signalling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogenic-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 31163-31171.
- **Dumont JE, Jauniaux J, Roger PP.** 1989. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 14: 67-71.
- **Eakin RM, Bus FE.** 1957. Development of the amphibian pituitary with special reference to the neural lobe. *Anat. Rec.* 129: 279.
- **Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztein WH, Kordon C.** 1980. Stimulation of in vitro prolactin release. *Neuroendocrinology* 31: 200-204.
- **Fagin JA, Pixley S, Slanina, Melmed S.** 1987. IGF-I gene expression in GH3 rat pituitary cells: messenger ribonucleic acid, immunohistochemistry and secretion. *Endocrinology* 120: 2037-2043.



- **Fahti Z, Cunningham AM, Iben I, Battaglino PB, Ward SA, Nichol KA, Pine KA, Goldstein ME, Lismaa TP, Zimanyi A.** 1997. Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol. Brain Res.* 51: 49-59.
- **Felix R, Meza U, Cota G.** 1995. Induction of classical lactotropes by epidermal growth factor in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 136: 939-946.
- **Fink G, Koch Y, Ben Aroya N.** 1982. Release of thyrotropin releasing hormones into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res.* 243: 186-189.
- **Fomina AF, Levitan ES.** 1997. Control of  $\text{Ca}^{2+}$  channel current and exocytosis in rat lactotrophs by basally active protein kinase C and calcineurin. *Neuroscience* 78: 523-531.
- **Foncea R, Andersson M, Kettermann A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S.** 1997. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 19115-19124.
- **Franke TF, Cantley LC.** 1997. Apoptosis: a Bad kinase makes good. *Nature* 390: 116-117.
- **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G.** 2000. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80: 1523-1631.
- **Friedman E, Krieger DT, Mezey E, Léránth CS, Brownstein MJ, Palkovits M.** 1983. Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. *Endocrinology* 112: 1943-1947.
- **Frödin M, Peraltti P, Van Obberghen E.** 1994. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 6207-6214.

- **Gabriel SM, Kaplan LM, Martín JB, Koenig JI.** 1989. Tissue-specific sex differences in galanin-like immunoreactivity and galanin mRNA during development in the rat. *Peptides* 10: 369-374.
- **Gale CC, Taleisnik S, Friedman HM, McCann SM.** 1961. Hormonal basis for impairments in milk synthesis and milk ejection following hypothalamic lesions. *J. Endocrinology* 23: 303.
- **García-Segura LM, Pérez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Aleman I.** 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res.* 560: 167-174.
- **Gershengorn MC, Geras E, Purello VS, Rebecchi MJ.** 1984. Inositol triphosphate mediates thyrotropin-releasing hormone mobilisation of nonmitochondrial calcium in rat mammotrophic pituitary cells. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 10675-10681.
- **Gersten BE, Baker BL.** 1970. Local action of intrahypophyseal implants of estrogen as revealed by staining with peroxidase-labeled antibody. *Am. J. Anat.* 128: 1-19.
- **Giannattasio G, DeFerrari ME, Spada A.** 1981. Dopamine-inhibited adenylate cyclase in female rat adenohypophysis. *Life Science* 28: 1605.
- **Gibbs DM.** 1984. High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 114: 1216-1218.
- **Giguere V, Meunier H, Veilleux R, Labrie F.** 1982. Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine, thyrotropin releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. *Endocrinology* 111: 857-862.

- **Gilchrist CA, Park JHY, MacDonald RG, Shull JD.** 1995. Estradiol and triiodothyronine increase production of insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) by GH4C1 rat pituitary tumour cells. *Mol. Cell. Endocrinology* 114: 147-156.
- **Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE.** 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* 14: 951-962.
- **Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME.** 1994. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77: 713-725.
- **Goldsmith PC, Cronin MJ, Weiner RL.** 1979. Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1205-1207.
- **Goodyer CG, de Stephano L, Lai WH, Guyda HJ, Posner BI.** 1984. Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus and brain. *Endocrinology* 114: 1187-1195.
- **Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE.** 1995. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62: 147-154.
- **Grandison L, Guidotti A.** 1979. Gamma-aminobutyric acid receptor function in rat anterior pituitary: evidence for control of prolactin release. *Endocrinology* 105: 754-759.
- **Gratzner, HG.** 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo and 5-Iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475.
- **Graves LM, Lawrence Jr JC.** 1996. Insulin, growth factors, and cAMP. *Trends Endocrinol. Metab.* 7: 43-50.



- **Graves LM, Guy HI, Kozlowsk P, Huang M, Lazarowski E, Marshall R, Collins MA, Dahistrand EN, Shelton Earp III H, Evans DR.** 2000. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP Kinase. *Nature* 403: 328-332.
- **Greenwood FC, Hunter WH, Glober FS.** 1963. The preparation of <sup>131</sup>I labelled growth hormone of high specific radioactivity. *Journal Biochem.* 89: 114.
- **Gregerson KA.** 2001. Mechanism of dopamine action on the lactotrophs. In: Horseman ND, ed. *Prolactin*. Boston Kluwer: 45-61.
- **Gressens P, Hill JM, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE.** 1993. Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature* 362: 155-158.
- **Gressens P, Paindaveine B, Hill JM, Evrard P, Brenneman DE.** 1998. Vasoactive intestinal peptide shortens both G1 and S phases of neural cell cycle in whole postimplantation cultured mouse embryos. *European Journal of Neuroscience* 10: 1734-1742.
- **Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJS.** 2000a. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signalling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 3722-3728.
- **Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodmand RH, Stork PJS.** 2000b. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap 1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 34433-34441.
- **Gross DS.** 1983. Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 112: 733-744.

- **Grosvenor CE, Mena F, Whitworth NS.** 1980. Evidence that the dopaminergic prolactin-inhibiting factor mechanism regulates only the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology* 106: 481-485.
- **Hall P, Wood A.** 1990. Immuno-histochemical markers of cellular proliferation achievements, problems and prospects. *Cell. Tissue Kinet.* 23:505.
- **Hammond PJ, Khandan-Nia N, Withers DJ, Jones PM, Ghatei MA, Bloom SR.** 1997. Regulation of anterior pituitary galanin and VIP by oestrogen and prolactin status. *J. Endocrinology* 152: 211-219.
- **Hansen TO, Rehfeld JF, Nielsen FC.** 1999. Mitogenic activated protein kinase and protein kinase A signaling pathways stimulate cholecystokinin transcription via activation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. *Molecular Endocrinology* 13: 466-475.
- **Hashi A, Mazawa S, Chen S, Yamakawa K, Kato J, Arita J.** 1996. Estradiol induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 137: 3246-3252.
- **Hayashi I.** 1984. Growth of GH3, a rat pituitary cell line, in serum-free, hormone-supplemented medium. In *Methods for Serum-Free Culture of Cells of the Endocrine system*, Eds DW Barnes, Da Sirbasku, GH Sato. New York: Alan R Liss, Inc: 1-13.
- **Heritier AG, DuBois PM.** 1994. Re-evaluation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action on pituitary cell differentiation with special regard to its effect on LH and TSH cell types. *J. Neuroendocrinology* 6: 33-37.
- **Hernández ER, Roberts CT Jr, LeRoith D, Adashi EY.** 1989 Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology* 125: 572-574.

- **Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.** 1993. Identification of an oncoprotein- an UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7: 2135-2148.
- **Holzbauer M, Racke K.** 1985. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med. Biol.* 63: 97-116.
- **Horvath E, Kovacs K, Ezsin C.** 1977. Junctional contact between lactotrophs and gonadotrophs in the rat pituitary. *IRCS Med. Science* 5: 511.
- **Horvitz HR.** 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59: 1701-1706.
- **Howe LR, Leever SJ, Gómez N, Nakielnny S, Cohen P, Marchall CJ.** 1992. Activation of the MAP Kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell* 71: 335-342.
- **Hsu DW, El-Azouzi M, Black PM, Chin WW, Hedley-White ET, Kaplan LM.** 1990. Estrogen increases galanin immunoreactivity in hyperplastic prolactin-secreting cells in Fisher 344 rats. *Endocrinology* 126: 3159-3167.
- **Humbel RE.** 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 190: 445-464.
- **Hyde JF, Moore Jr JP, Cai A.** 1998. Galanin in normal and hyperplastic anterior pituitary cells. *Ann. NY Acad. Science* 863: 48-55.
- **Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR.** 1998. Cross talk between ERK and PKA is required for  $Ca^{2+}$  stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21: 869-883.

- **Iturriza FC, Rubio MC, Gómez Dumm CLA, Zieher LM.** 1983. Catecholamine metabolizing enzymes and synthesis of dopamine in normal and grafted pituitary pars distalis. *Neuroendocrinology* 37: 371-377.
- **Jaiswal RK, Moodie SA, Wolfman A, Landreth GE.** 1994. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21 ras. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6944-6953.
- **Jang YC, Kao LS, Wang FF.** 1998. Involvement of Ca<sup>2+</sup> signalling in the VIP and 8-Br-cAMP induction of c-fos mRNA expression. *Cell Signal* 10: 27-34.
- **Johnston CA, Negro-Vilar A.** 1988. Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology* 122: 341-350.
- **Johnston JM, Wood DF, Read S, Johnston DG.** 1993. Dopamine regulates D2 receptor gene expression in normal but not in tumorous rat pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 92: 63-68.
- **Jones PM, Ghatel MA, Steele J, O'Halloran D, Gon G, Legon S, Burrin JM, Leonhardt U, Polak JM, Bloom SR.** 1989. Evidence for neuropeptide Y synthesis in the rat anterior pituitary and the influence of thyroid hormone status: comparison with vasoactive intestinal peptide, substance P and neurotensin. *Endocrinology* 125: 334-341.
- **Jones JI, Clemmons DR.** 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 16: 3-34.
- **Journot L, Homburger V, Pantaloni C, Priam M, Bockaert J, Enjalbert A.** 1987. An islet-activating protein-sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and TRH-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262: 15106-15110.

- **Kaplan LM, Gabriel SM, Koenig JI, Sunday ME, Spindel ER, Martin JB, Chin WW.** 1988. Galanin is an estrogen-inducible, secretory product of the rat anterior pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7408-7412.
- **Kasper S, Popescu RA, Torsello A, Vrontakis ME, Ikejiani C, Friesen HG.** 1992. Tissue-specific regulation of vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid levels by estrogen in the rat. *Endocrinology* 130: 1796-1801.
- **Kato Y, Chinara K, Ohgo S, Iwasaki Y, Abe H, Imura H.** 1976. Growth hormone and prolactin release by substance P in rats. *Life Sci.* 19: 441-446.
- **Kato Y, Iwasaki Y, Iwasaki J, Abe H, Yanaihara N, Imura H.** 1978. Prolactin release by vasoactive intestinal polypeptide in rats. *Endocrinology* 103: 554-558.
- **Kawano H, Daikoku S.** 1987. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 265: 242-253.
- **Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N.** 1997. The PI3-Kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & Development* 11: 701-713.
- **Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N.** 1999. Akt/PKB inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5800-5810.
- **Kievit P, Lauten JD, Maurer RA.** 2001. Analysis of the role of the mitogenic-activated protein kinase in mediating cyclic-adenosine 3', 5'-monophosphate effects on prolactin promoter activity. *Molecular Endocrinology* 15: 614-624.
- **Kimura T, Van Keymeuleu A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP.** 2001. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. *Endocrine Reviews* 22: 631-656.

- **Kiss JZ, Kanyicska B, Nagy GY.** 1986. The hypothalamic paraventricular nucleus has a pivotal role in regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 119: 870-873.
- **Kordon C, Blake CA, Terkel J, Sawyer CH.** 1974. Participation of serotonin-containing neurons in the suckling-induced rise in plasma prolactin levels in lactating rats. *Neuroendocrinology* 13: 213-223.
- **Koshiyama H, Kato Y, Inoue T, Murakami Y, Ishikawa Y, Yanaihara N, Imura H.** 1987. Central galanin stimulates pituitary prolactin secretion in rats: possible involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide. *Neuroscience Lett.* 75: 49-54.
- **Kovacs K, Horvath E, Ezrin C.** 1989. Anatomy and histology of the normal and abnormal pituitary gland. *Endocrinology* 1: 264-283.
- **Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC.** 1993. Investigations of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53: 4701-4714.
- **Kulik G, Klippel A, Weber MJ.** 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595-1606.
- **Kwok RPS, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SGE, Green MR, Goodman RH.** 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226.
- **Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **Lam KSL, Reichlin S.** 1989. Pituitary vasoactive intestinal peptide regulates prolactin secretion in the hypothyroid rat. *Neuroendocrinology* 50: 524-528.

- **Lam KSL, Srivastava G, Lechan RM, Lee T, Reichlin S.** 1990. Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 52: 417-421.
- **Lam KSL.** 1991. Vasoactive intestinal peptide in the hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology* 53: 45-51.
- **Lam KSL, Srivastava G, Tam P.** 1992. Divergent effects of glucocorticoid on the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the rat cerebral cortex and pituitary. *Neuroendocrinology* 56: 32-37.
- **Lamberts SWJ, MacLeod RM.** 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.* 70: 279-318.
- **Langford KS, Miell JP.** 1993. The insulin-like growth factor I/binding protein axis: physiology, pathophysiology and therapeutic manipulation. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 503-516.
- **Lara JI.** Caracterización y regulación de VIP hipofisario y su participación en sistemas de regulación paracrina. Tesis Doctoral. Madrid 1991.
- **Lara JI, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Tolón RM, Balsa JA, López-Fernández J, Sánchez-Franco F.** 1994. Induction of vasoactive intestinal peptide gene expression and prolactin secretion by insulin-like growth factor I in rat pituitary cells: evidence for an autoparacrine regulatory system. *Endocrinology* 135: 2526-2532.
- **Lechan RM, Jackson IMD.** 1982. Immunohistochemical localization of thyrotropin releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111: 55-65.
- **Lee W, Lin C, Curren T.** 1988. Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5521-5527.

- **Leong DA, Frawley LS, Nelly JD.** 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 45: 109-127.
- **Le Péchon-Vallée C, Magalon K, Rasolonjanahary R, Enjalbert A, Gérard C.** 2000. Vasoactive intestinal polipeptide and PACAP stimulate mitogen-activated protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate pathway. *Neuroendocrinology* 72: 46-56.
- **Léránth CS, Palkovits M, Krieger DT.** 1983. Serotonin immunoreactive nerve fibers and terminals in the rat pituitary light and electron-microscopic studies. *Neuroscience* 9: 289-296.
- **LeRoith D, Werner H, Beitner, Johnson D, Roberts CT.** 1995. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine Reviews* 16: 143-163.
- **LeRoith D.** 2000. Insulin-like growth factor I receptor signalling-overlapping or redundant pathways? *Endocrinology* 141: 1287-1288.
- **LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu J, Butler A.** 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 22: 53-74.
- **Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Gorski J.** 1982. Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: regulation by estradiol. *Mol. Cell. Endocrinology* 25: 277-294.
- **Liu JW, Ben-Jonathan N.** 1994. Prolactin-releasing activity of neurohypophysial hormones: structure-function relationship. *Endocrinology* 134: 114-118.
- **Liu Y, Chrvia JC, Latchman DS.** 1998. Nerve growth factor up-regulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44<sup>MAPK</sup> cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 32400-32407.



- **López FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A.** 1991. Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4508-4512.
- **López JF, Domínguez JR, Sánchez-Franco F, Negro-Villar A.** 1989. Role of dopamine and vasoactive intestinal peptide in the control of pulsatile prolactin secretion. *Endocrinology* 124: 527-535.
- **López-Calderón A, Ariznavarreta C, Calderón MD, Tresguerres JAF, González-Quijano MI.** 1989. Role of the adrenal cortex in chronic stress-induced inhibition of prolactin secretion in male rats. *J. Endocrinology* 120: 269-273.
- **Lorenzo MJ, Sánchez-Franco F, De los Frailes MT, Reichlin S, Cacicedo L.** 1989. Synthesis and secretion of vasoactive intestinal peptide by rat fetal cerebral cortical and hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 125: 1983-1990.
- **Lorenzo MJ, Sánchez-Franco, De los Frailes MT, Tolón R, Fernández G, Cacicedo L.** 1992. Thyroid Hormone regulate synthesis and secretion of VIP by cultured fetal cerebral cortical cells. *Neuroendocrinology* 55: 59-65.
- **Lorenzo MJ, Gish GD, Houghton C, Stonehouse TJ, Pawson T, Ponder BAJ, Smith DP.** 1997. RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene* 14: 793-771.
- **Lowe WL, Roberts CT, Lasky SR, LeRoith D.** 1987. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8946-8950.
- **Lowe WL, Lasky SR, LeRoith D, Roberts CT.** 1988. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol. Endocrinology* 2: 528-535.

- **Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM.** 1983. Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 112: 1711-1717.
- **Marshall CJ.** 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 82-89.
- **Marshall CJ.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185.
- **Marte BM, Downward J.** 1997. PKB/Akt: connecting phosphoinositide-3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 22: 355-358.
- **Martínez de la Escalera G, Weiner IR.** 1992. Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrine Reviews* 13: 241-255.
- **Mau SE, Saermark T, Vilhardt H.** 1997. Cross-talk between cellular signalling pathways activated by substance P and vasoactive intestinal peptide in rat lactotroph-enriched pituitary cell cultures. *Endocrinology* 131: 1704-1711.
- **Maurer RA.** 1981. Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294: 94-97.
- **Maurer RA.** 1982a. Adenosine 3', 5'-monophosphate derivatives increase prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid levels in ergocryptine-treated pituitary cells. *Endocrinology* 110: 1957-1963.
- **Maurer RA.** 1982b. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 257: 2133-2136.
- **Maurer RA.** 1985. Selective binding of the estradiol receptor to a region at least one kilobase upstream from the rat prolactin gene. *DNA* 4: 1-9.

- **Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z.** 1999. Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of *tilapia*: apparent roles for insulin-like growth factor I and estradiol. *Endocrinology* 140: 1183-1191.
- **Mena F, Enjalbert A, Carbonelli L, Priam MM, Kordan C.** 1976. Effects of suckling on plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinology* 99: 445-451.
- **Merchenthaler I, Negro-Vilar A.** 1993. Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog. Neurobiol.* 40: 711-769.
- **Meyer DC, Quay WB.** 1976. Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin in vitro: twenty-four-hour changes in male and proestrous female rats. *Endocrinology* 98: 1160-1165.
- **Mezey E, Kiss JZ.** 1985. Vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 82: 245-247.
- **Michels KM, Lee W, Seltzer A, Saavedra JM, Bondy CA.** 1993. Up-regulation of pituitary [<sup>125</sup>I] Insulin-like growth factor I (IGF-I) binding and IGF binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology* 132: 23-29.
- **Minami S, Sarkar DK.** 1997. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits prolactin secretion and lactotropic cell proliferation in the pituitary of oestrogen-treated Fischer 344 rats. *Neurochem. Int.* 30: 499-506.
- **Missale CS, Castelletti L, Boroni F, Memo M, Spano PF.** 1991. Epidermal growth factor induces the functional expression of dopamine receptors in the GH3 cell line. *Endocrinology* 128: 13-20.

- **Missale CS, Boroni F, Losa M, Giovanelli M, Zanellato A, Dal Toso R, Balsari A, Spano PF.** 1993. Nerve growth factor suppresses the transforming phenotype of human prolactinomas. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 90: 7961-7965.
- **Missale CS, Boroni F, Sigala S, Zanellato A, Dal Toso R, Balsari A, Spano PF.** 1994. Nerve growth factor directs differentiation of the bipotential cell line GH-3 into the mammotroph phenotype. *Endocrinology* 135: 290-298.
- **Missale CS, Boroni F, Frassine M, Caruso A, Spano PF** 1995. Nerve growth factor promotes the differentiation of pituitary mammotroph cells in vitro. *Endocrinology* 136: 1205-1213.
- **Missale CS, Boroni F, Sigala S, Buriani A, Fabris M, Leon A, Dal Toso R, Spano PF.** 1996. Nerve growth factor in the anterior pituitary: localization in mammotroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4240-4245.
- **Missale CS, Spano PF.** 1998. Growth factors in the pathogenesis of prolactin-secreting tumors. *J. Endocrinology Invest.* 21: 402-411.
- **Miyake A, Tasaka K, Otsuka S, Kohmura H, Wakimoto H, Aono T.** 1985. Epidermal growth factor stimulates secretion of rat pituitary luteinizing hormone-releasing hormone *in vitro*. *Acta Endocrinology (Copenh.)* 108: 175-178.
- **Montminy M.** 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 807-822.
- **Morel G, Besson J, Rosselin G, Dubois PM.** 1982a. Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 34: 85-89.

- **Morel G, Chayvialle JA, Kerdelhue B, Dubois PM.** 1982b. Ultrastructural evidence for endogenous substance P-like immunoreactivity in the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 35: 82-86.
- **Morgan DO, Jarnagin K, Roth RA.** 1986. Purification of the receptor for insulin-like growth factor I. *Biochemistry* 25: 5560-5564.
- **Morikawa M, Nixon T, Green H.** 1982. Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29: 783-789.
- **Mouihate A, Lestage J.** 1995. Epidermal growth factor: a potential paracrine and autocrine system within the pituitary. *Neuroreport*. 6: 1401-1404.
- **Mouite A, Verrier D, Lestage J.** 1996. EGF release by rat gonadotroph cells: characteristics and effects of LHRH. *Life Science* 58: 107-114.
- **Muller JM, Lelievre V, Becq-Giraudon L, Meunier AC.** 1995. VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Mol. Neurobiology* 10: 115-134.
- **Murai I, Reichlin S, Ben-Jonathan N.** 1989. The peak phase of the proestrus prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to VIP. *Endocrinology* 124: 1050-1055.
- **Murata T, Ying S-Y.** 1991. Transforming growth factor- $\beta$  and activin inhibit basal secretion of prolactin in a pituitary monolayer culture system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198: 599-605.
- **Murdoch GH, Potter E, Nicolaisen AK, Evans RM, Rosenfeld MG.** 1982. Epidermal growth factor rapidly stimulates prolactin gene transcription. *Nature* 300: 192-194.

- **Murdoch GH, Franco R, Evans RM, Rosenfeld MG.** 1983. Polypeptide hormone regulation of gene expression. Thyrotropin-releasing hormone rapidly stimulates both transcription of the prolactin gene and the phosphorylation of a specific nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 285: 15329-15335.
- **Murphy LJ, Bell GI, Friersen HG.** 1987. Tissue distribution of IGF-I and IGF-II messenger ribonucleic acid in adult rat. *Endocrinology* 120: 1279-1282.
- **Nakajima T, Fukamizu A, Takahashi J, Gage FH, Fisher T, Blenis J, Montminy MR.** 1996. The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90rsk. *Cell* 86: 465-474.
- **Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Parvin JD, Montminy MR.** 1997. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal dependent factors. *Genes development* 11: 738-747.
- **Nakane PK.** 1975. Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. In: *The Anterior Pituitary*, edited by A Tixier-Vidal and MG Farquhar. Academic Press, New York: 45-61.
- **Neill JD.** 1974. Prolactin: its secretion and control. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology. The Pituitary Gland and Its Neuroendocrine Control*. Washington, DC: Am. Physiol. Soc., sect. 7, vol. IV: 469-488.
- **Oguchi A, Tanaka S, Yamamoto K, Kikuyama S.** 1996. Release of  $\alpha$ -subunit of glycoprotein hormones from the bullfrog pituitary: possible effect of  $\alpha$ -subunit on prolactin cell function. *Gen. Comp. Endocrinology* 102: 141-146.
- **O'Halloran DJ, Jones PM, Steel JH, Gon G, Giaid A, Ghatei MA, Polack JM, Bloom SR.** 1990. Effect of endocrine manipulation on pituitary galanin in the rat. *Endocrinology* 127: 467-475.

- **Oomizu S, Takeuchi S, Takahashi S.** 1998. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I on proliferation of mouse pituitary cells in serum-free culture. *Journal of Endocrinology* 157: 53-62.
- **Osamura RY, Watanabe K.** 1985. Histogenesis of the cells of the anterior and intermediate lobes of human pituitary glands: immunohistochemical studies. *Int. Rev. Cytol.* 95: 103-129.
- **Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S.** 2000. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature Cell Biology* 2: 805-811.
- **Page RB.** 1983. Directional pituitary blood flow: a microcinematographic study. *Endocrinology* 112: 157-165.
- **Pan JT, Gala RR.** 1987. The influence of raphe lesions, p-chlorophenylalanine and ketanserin on the estrogen-induced afternoon prolactin surge. *Endocrinology* 120: 2070-2077.
- **Párrizas M, LeRoith D.** 1997a. Insulin-like growth factor-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138:1355-1358.
- **Párrizas M, Saltiel AR, LeRoith D.** 1997b. Insulin-like growth factor I inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 154-161.
- **Pasqualini C, Levie V, Guibert B, Faucon Biguet N, Kerdelhue B.** 1991. Inhibitory actions of acute estradiol treatment on the activity and quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence of ovariectomized rats. *J. Neuroendocrinology* 3: 575-580.

- **Pastorcic M, De A, Boyadjieva N, Vale W, Sarkar DK.** 1995. Reduction in the expression and action of transforming growth factor beta 1 on lactotropes during estrogen-induced tumorigenesis in the anterior pituitary. *Cancer Res.* 55: 4892-4898.
- **Patterson JC, Childs GV.** 1994. Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology* 135: 1689-1696.
- **Pazos F.** Papel fisiológico del sistema GH-IGF-I en la maduración sexual y su regulación por el eje gonadotropo en la pubertad de la rata macho. Tesis Doctoral. Madrid. 1995.
- **Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** 2001. Mitogenic-activated protein (MAP) Kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22: 153-183.
- **Pilotte NS, Porter JC.** 1981. Dopamine in hypophysial portal plasma and prolactin in systemic plasma of rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 108: 2137-2141.
- **Pincus DW, DiCicco-Bloom EM, Black IB.** 1990. Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature* 343: 564-567.
- **Proesmans M, Van Bael A, Andries M, Denef C.** 1997. Mitogenic effects of nerve growth factor on different cell types in reaggregate cell cultures of immature rat pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 134: 119-127.
- **Pryor-Jones RA, Silverlight JJ, Kennedy SJ, Jenkins JS.** 1988. Vasoactive intestinal peptide and the stimulation of lactotroph growth by oestradiol in rats. *Journal of Endocrinology* 116: 259-265.
- **Pryor-Jones RA, Silverlight JJ, Jenkins JS.** 1989. Oestradiol, vasoactive intestinal peptide and fibroblast growth factor in the growth of human pituitary tumour cells in vitro. *Journal of Neuroendocrinology* 120: 171-177.



- **Pugazhenth S, Boras T, O'Connor D, Meintzer MK, Heidenreich KA, Reusch JE-B.** 1999a. Insulin-like growth factor-I-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 2829-2837.
- **Pugazhenth S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE-B.** 1999b. Insulin-like growth factor-I induces Bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 27529-27535.
- **Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE-B.** 2000. Akt/Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 10761-10766.
- **Rawlings SR, Hezareh M.** 1996. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocrine Reviews* 17: 4-29.
- **Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J.** 1978. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* 200: 1173-1175.
- **Reed JC.** 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236.
- **Reiss K, Valentinis B, Tu X, Xu SQ, Baserga R.** 1998. Molecular markers of IGF-I-mediated mitogenesis. *Exp. Cell. Res.* 242: 361-372.
- **Ren P, Schelthauer BW, Halper J.** 1994. Immunohistological localization of TGF $\alpha$ , EGF, IGF-I and TGF $\beta$  in the normal human pituitary gland. *Endocrine Pathology* 5: 40-48.
- **Renner U, Mojto J, Arzt E, Lange M, Stalla J, Müller D-A, Stalla GK.** 1993. Secretion of polypeptide growth factors by human nonfunctioning pituitary adenoma cells in culture. *Neuroendocrinology* 57: 825-834.

- **Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK.** 1996. Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors. Cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *European Journal Endocrinology* 135: 515-532.
- **Richards JS.** 2001. New signalling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular Endocrinology* 15: 209-218.
- **Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, Greenberg ME.** 1993. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6260-6273.
- **Robberecht P, Deschodt-Lanckman M, Camus JC, DeNeef P, Lambert M, Christophe J.** 1979. VIP activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 103: 229-233.
- **Roger PP, Reuse S, Maenhaut C, Dumont JE.** 1995. Multiple facets of the modulation of growth by cAMP. *Vitam. Horm.* 51: 59-191.
- **Roger PP, Demartin S, Dumont JE.** 1999. Nature of the critical labile event that controls RB phosphorylation in the cyclic AMP-dependent cell cycle of thyrocytes in primary culture. *Exp. Cell. Res.* 252: 492-498.
- **Rotsztejn WH, Dussaillant M, Nabou F, Rosselin G.** 1981. Rapid glucocorticoid inhibition of vasoactive intestinal polypeptide-induced cyclic AMP accumulation on prolactin release in rat pituitary cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7584-7588.
- **Rotwein P, Bichell DP, Kikuchi K.** 1993. Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol. Reproduction Dev.* 35: 358-364.

- **Saiardi A, Bozzi Y, Baik J-H, Borrelli E.** 1997. Antiproliferative role of dopamine: loss of D<sub>2</sub> receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 19: 115-126.
- **Said SI.** 1986. Vasoactive intestinal peptide. *J. Endocrinology Inves.* 9: 191-200.
- **Samson WK, Bianchi R, Mogg RJ, Rivier J, Vale W, Melin P.** 1989. Oxytocin mediates the hypothalamic action of vasoactive intestinal peptide to stimulate prolactin secretion. *Endocrinology* 124: 812-819.
- **Sara VR, Hall K.** 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 70: 591-614.
- **Sarkar DK, Kim KH, Minami S.** 1992. Transforming growth factor  $\beta$  1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its actions on prolactin secretion and lactotropic growth. *Mol. Endocrinology* 6: 1825-1833.
- **Sato S.** 1980. Postnatal development, sexual difference and sexual cyclic variation of prolactin cells in rats: Special reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocrinology Jpn.* 27: 573-583.
- **Sato T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang HG, Reed JC.** 1994. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9238-9242.
- **Sato K, Watanabe YG.** 1998. Corticosteroids stimulate the differentiation of growth hormone cells but suppress that of prolactin cells in the fetal rat pituitary. *Arch. Histol. Cytol.* 61: 75-81.
- **Schally AV, Redding TW, Arimura A, Dupont A, Linthicum GL.** 1977. Isolation of gamma-amino butyric acid from pig hypothalamus and demonstration of its prolactin inhibiting (PIF) activity *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 100: 681-691.

- **Scharrer E, Scharrer B.** 1954. Hormones produced by neurosecretory cells. *Rec. Prog. Horm. Res.* 10: 183.
- **Schofield JG.** 1983. Use of a trapped fluorescent indicator to demonstrate effects of thyroliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. *FEBS Lett.* 159: 79-82.
- **Schwartz J.** 2000. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews* 21 (5): 488-513.
- **Scrimgeour AG, Blakesley VA, Stannard BS, LeRoith D.** 1997. Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways are not sufficient for insulin-like growth factor I-induced mitogenesis and tumorigenesis. *Endocrinology* 138: 2552-2558.
- **Scully KM, Rosenfeld MG.** 2002. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295: 2231-2235
- **Segal RA, Greenberg ME.** 1996. Intracellular signalling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neuroscience* 19: 463-489.
- **Segerson TP, Lam KSL, Cacicedo L, Minamitani N, Fink JS, Lechan RM, Reichlin S.** 1989. Thyroid hormone regulates vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA levels in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 125: 2221-2223.
- **Selmanoff M, Wise PM.** 1981. Decreased dopamine turnover in the median eminence in response to suckling in the lactating rat. *Brain Res.* 212: 101-115.
- **Seternes OM, Sorensen R, Johansen B, Loennechen T, Aarbakke J, Moens U.** 1998. Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/mapkinase – and protein kinase A signalling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites. *Biochimica et Biophysica Acta* 1395: 345-360.

- **Seuntjens E, Vankelecom H, Quaegebeur A, Vande-Vijver V, Denef C.** 1999. Targeted ablation of gonadotrophs in transgenic mice affects embryonic development of lactotrophs. *Mol. Cell. Endocrinology* 150: 129-139.
- **Shamgochian MD, Leeman SE.** 1992. Substance P stimulates luteinizing hormone secretion from anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 131: 871-875.
- **Shaywitz AJ, Greenberg ME.** 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 821-861.
- **Sheehan HL, Kovacs K.** 1982. Neurohypophysis and hypothalamus. *Endocrine Pathology*. Baltimore. Williams and Wilkins: 45-49.
- **Sheng M, Mc Fadden G, Greenberg ME.** 1990. Membrane depolarisation and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571-582.
- **Sherr CJ.** 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Science* 20: 187-190.
- **Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Katakami H, Yanaihara N, Imura H.** 1981. Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in rat hypophyseal portal blood. *Endocrinology* 108: 395-398.
- **Simmonds SH, Strange PG.** 1985. Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neuroscience Lett.* 60: 267-272.
- **Stefaneanu L, Pavell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A.** 1999. Somatotroph and lactotroph changes in the adenohypophysis of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 140: 3881-3889.

- **Stiles CD, Capone GT, Scher CD, Antoniades HN Van Wyk JJ, Pledger WJ.** 1979. Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1279-1283.
- **Stoof JC, Kebabian JW.** 1984. Two dopaminergic receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Science* 35: 2281.
- **Suzuki S, Yamamoto I, Arita J.** 1999. Mitogen-activated protein kinase-dependent stimulation of proliferation of rat lactotrophs in culture by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 140: 2850-2858.
- **Swennen L, Deneff C.** 1982. Physiological concentrations of dopamine decrease adenosine 3', 5'- monophosphate levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: evidence for a casual relationship to inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 111: 398-405.
- **Takahashi S, Oomizu S, Honda J, Takeuchi S.** 1997. Insulin-like growth factor I system in the mouse pituitary. In: Kawashima S, Kikuyama S (eds.) *Advances in Comparative Endocrinology. Proceedings of the XIII International Congress of Comparative Endocrinology.* Monduzzi Ed. Bologna: 1123-1126.
- **Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M.** 1998. Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Mol. Brain Res.* 58: 27-39.
- **Tappaz ML.** 1984. GABA and anterior pituitary function: anatomical data. *Psychoneuroendocrinology* 9: 85-95.
- **Tashjian AHJ, Barowsky NJ, Jensen DK.** 1971. Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 516-523.

- **Tilemans D, Jacob GFM, Andries M, Proost P, Devreese B, Van Damme J, Van Becumen J, Deneef C.** 1994. Isolation of two peptides from rat gonadotroph-conditioned medium displaying an amino acid sequence identical to fragments of secretogranin II. *Peptides* 15: 537-545.
- **Todd JF, Small CJ, Akinsanya KO, Stanley SA, Smith DM, Bloom SR.** 1998. Galanin is a paracrine inhibitor of gonadotroph function in the female rat. *Endocrinology* 139: 4222-4229.
- **Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC.** 1999. The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 18: 4779-4793.
- **Toni R, Kakucska I, Mosca S, Marrama P, Lechan RM.** 1992. Hypothyroidism increases vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactivity and gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 131: 976-978.
- **Tougard C, Tixier-Vidal A.** 1994. Lactotropes and gonadotropes. In: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, and Neill J (ed.). New York: Raven Press: 1711-1747.
- **Tramontano D, Moses AC, Veneziani BM, Ingbar SH.** 1988. Adenosine 3',5'-monophosphate mediates both the mitogenic effect of thyrotropin and its ability to amplify the response to insulin-like growth factor I in FRTL5 cells. *Endocrinology* 122: 127-132.
- **Treisman R.** 1992. The serum response element. *TIBS* 17: 423-426.
- **Treisman R.** 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 205-215.

- **Vaccarino FM, Hayward MD, Le HN, Hartigan DJ, Duman RS, Nestler EJ.** 1993. Induction of immediate early genes by cAMP in primary cultures of neurons from rat cerebral cortex. *Mol. Brain Res.* 19: 76-82.
- **Van Bael A, Deneff C.** 1996. Evidence for a trophic action of the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit in rat pituitary. *Journal Neuroendocrinology* 8: 99-102.
- **Van de Kar LD, Rittenhouse PA, Li Q, Levy AD.** 1996. Serotonergic regulation of renin and prolactin secretion. *Behav. Brain Res.* 73: 203-208.
- **Vician L, Shupnik MA, Gorski J.** 1979. Effects of estrogen on primary ovine pituitary cell cultures: stimulation of prolactin secretion, synthesis and preprolactin messenger ribonucleic acid activity. *Endocrinology* 104: 736-743.
- **Vincent SR, Hökfelt T, Wu JY.** 1982. GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 34: 117-125.
- **Voltek A, Gollenberg S, Cooper JA.** 1993. Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 74: 205-214.
- **Vossier MR, Yao H, York RD, Pan M-G, Rim CS, Stork PJS.** 1997. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89: 73-82.
- **Wanke IE, Rorstad OP.** 1990. Receptors for vasoactive intestinal peptide in rat anterior pituitary glands: localization of binding to lactotropes. *Endocrinology* 126: 1981-1988.
- **Waterman ML, Adler S, Nelson C, Greene GL, Evans RM, Rosenfeld MG.** 1988. A single domain of the estrogen receptor confers deoxyribonucleic acid binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 2: 14-21.
- **Werner H, Woloschak M, Stannard B, Shen-Orr Z, Roberts CT, LeRoith D.** 1991. The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity and regulation. *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects.* LeRoith D (Ed.) CRC: 17-48.



- **West B, Dannies PS.** 1980. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology* 106: 1108-1113.
- **White MF.** 1998. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 53: 119-138.
- **Whitmarsh AJ, Davis RJ.** 2000. A central control for cell growth. *Nature* 403: 255-256.
- **Wilson JD, Foster DW (ed.).** 1985. *Williams Textbook of Endocrinology.* W.B. Saunders Company pp: 492-568.
- **Wynick D, Hammond PJ, Akinsanya KO, Bloom SR.** 1993. Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. *Nature* 364: 529-532.
- **Wynick D, Small CJ, Bacon A, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NC, Ghatei M, Talamantes F, Bloom SR, Pachnis V.** 1998. Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 95: 12671-12676.
- **Xing J, Ginty DD, Greenberg ME.** 1996. Coupling of the Ras-MAPK pathways to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273: 959-963.
- **Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME.** 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1946-1955.
- **Yamamoto K, Hirai A, Ban T, Saito J, Tahara K, Terano T, Tamura Y, Saito Y, Kitagawa M.** 1996. Thyrotropin induces G<sub>1</sub> cyclin expresión and accelerates G<sub>1</sub> phase after insulin-like growth factor I stimulation in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 137: 2036-2042.

- **Yamasaki H, Prager D, Gebremednin S, Moise L, Melmed S.** 1991. Binding and action of insulin-like growth factor I in pituitary tumors cells. *Endocrinology* 128: 857-862.
- **Yang SH, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD.** 1998. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* 17: 1740-1749.
- **Yao RJ, Cooper GM.** 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.
- **Yao RJ, Cooper GM.** 1996. Growth factor-dependent survival of rodent fibroblasts requires phosphatidylinositol-3'-kinase but is independent of pp70S6K activity. *Oncogene* 13: 343-351.
- **Yonehara T, Kanasaki H, Yamamoto H, Fukunaga K, Miyazaki K, Miyamoto E.** 2001. Involvement of mitogen-activated protein kinase in cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-induced hormone gene expression in rat pituitary GH3 cells. *Endocrinology* 142: 2811-2819.
- **Yoshimura f, Nogani H.** 1980. Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rat. *Endocrinology Jpn.* 27: 43-51.
- **Yu R, Ashworth R, Hinkle PM.** 1998. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid* 8: 887-894.
- **Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ.** 1997. BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-xL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 272: 24101-24104.
- **Zheng C-F, Guan K.** 1993. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J. Biol. Chem.* 268: 11435-11439.

- **Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW.** 1996. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* 15: 4130-4141.
- **Zimmermann S, Moelling K.** 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* 286: 1741-1744.

